

MSC

2.º  
CICLO

FCUP  
2015

U. PORTO

Estágio na Aquacultura Safiestela  
Estudos da nutrição e alimentação em larvas de  
linguado (*Solea senegalensis*)

Joana Cláudia Morais da Silva Mendes

FC



# Estágio na Aquacultura Safiestela

## Estudos da nutrição e alimentação em larvas de linguado (*Solea senegalensis*)

Joana Cláudia Morais da Silva Mendes

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em  
Recursos Biológicos Aquáticos

2015





# Estágio na Aquacultura Safiestela

## Estudos da nutrição e alimentação em larvas de linguado (*Solea senegalensis*)

Joana Cláudia Morais da Silva Mendes

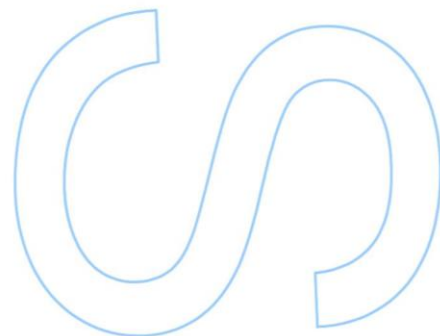
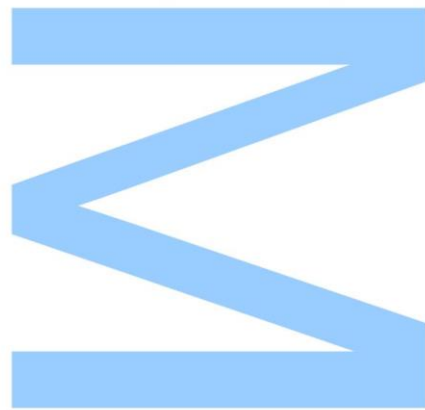
Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos  
Departamento de Biologia  
2015

### **Orientador**

Maria Helena Peres, Investigadora, CIIMAR

### **Coorientador**

Renata Serradeiro, Diretora de I&D, Sea8

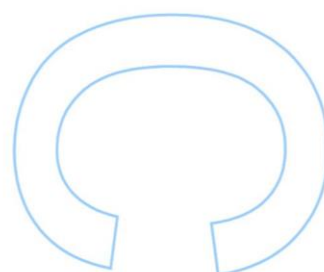
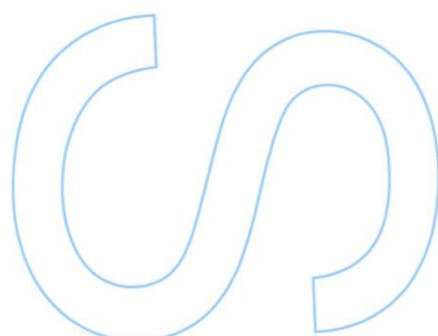
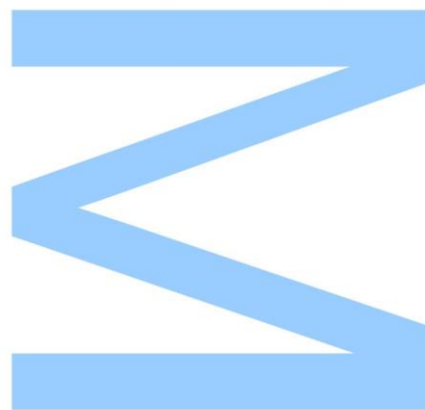




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



# Agradecimentos

Ao projeto Solea Weaning pela proposta do ensaio e pelo financiamento do mesmo.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto VEGICOR/AMINOAQUA, ref. 31-03-05-FEP-43.

À professora Helena Peres, por aceitar a orientação desta tese e por ter ajudado na proposta de estágio. Um muito obrigado pela disponibilidade, orientação, ajuda e paciência durante o tempo de estágio e na realização desta tese.

À Renata Serradeiro por aceitar o meu estágio na Safiestela e por me proporcionar os ensaios que levaram ao enriquecimento desta tese. Agradeço, ainda, pela ajuda, orientação, oportunidades de aprendizagem, disponibilidade e apoio ao longo do estágio e escrita da tese.

Ao Diogo Rosado por aceitar o meu estágio na Safiestela e pela disponibilidade, ajuda, paciência e ensino durante os ensaios e integração nas atividades de produção.

A todos os membros da empresa Safiestela (Isidro, Evaristo, Cidália, Marta, Luís, Filipe, Ildefonso, Paulo, Inês, Hélder) pela ajuda durante o estágio e os ensaios, pela amizade que se criou, pela integração e disponibilidade demonstrada para ensinar as técnicas de produção. Um muito obrigado aos funcionários noturnos, pela ajuda na alimentação das larvas.

Ao Wilson Pinto por me proporcionar os ensaios utilizados nesta tese. Agradeço, ainda, a disponibilidade prestada e a ajuda para resolver os problemas que surgiram durante e após os ensaios, os ensinamentos que me forneceu, a ajuda no tratamento estatístico e orientação.

Aos meus pais e ao meu irmão, Zé Pedro, pela paciência e apoio incondicional. Sem vocês, a motivação para a realização do estágio e da tese não teria sido a mesma. Um muito obrigado por estarem sempre lá para mim, por me ajudarem nos momentos mais difíceis, por me aconselharem quando mais necessitei e por acreditarem em mim.

Ao meu namorado, Ismael Silva, pela paciência durante os meus desabafos quando as coisas não corriam da melhor maneira. Obrigada pelo apoio, ajuda, conselhos e motivação que levaram ao desenvolvimento desta tese.

À minha madrinha, Lina Almeida, pelo apoio e correção do *abstract*.

Aos meus avós, pelo apoio e motivação que me deram.

Ao Filipe Furtado, por ser o meu braço direito durante os ensaios. Pela ajuda prestada, pela paciência durante as fases mais críticas e pela amizade.

À Marta Pinto, sem ti, este estágio não teria sido a mesma coisa. Obrigada pelo companheirismo, paciência, desabafos, ajuda durante as fases mais complicadas dos ensaios, pela companhia nas viagens para a empresa, no desenvolvimento desta tese, pela troca de conhecimentos, pela ajuda e apoio na escrita e pela amizade que estará sempre presente.

À Ana Couto pela ajuda na utilização do liofilizador e no laboratório, pela compreensão e disponibilidade demonstrada.

A todos que pertencem ao laboratório da Nutrimu da FCUP, pela ajuda, compreensão e ensino durante o tempo que lá passei.

À Sara Moutinho, pelos desabafos durante a altura que passei na faculdade a tratar dos dados dos ensaios, pela amizade e pela ajuda e apoio durante a escrita da tese.

# Resumo

Para a conclusão do Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos foi realizado um estágio na Safiestela – Sustainable Aqua Farming Investments, Lda., uma maternidade de linguado senegalês (*Solea senegalensis*). Esta piscicultura abrange desde a manipulação dos reprodutores para a obtenção de ovos até à fase de pré-engorda. Os juvenis são depois transportados para a Aquacria, na Torreira, para a engorda dos mesmos. Estas duas unidades pertencem ao grupo Sea8.

O estágio decorreu de 11 de Setembro de 2014 a 21 de Maio de 2015, onde foram adquiridos conhecimentos na produção de linguado senegalês, nomeadamente na manutenção dos reprodutores e ovos, e manutenção de larvas e juvenis. Foram, ainda, adquiridos conhecimentos na manutenção de alimento vivo, nomeadamente artémia e rotíferos. Uma vez que, em algumas áreas de produção desta empresa se trabalha em sistema de recirculação (RAS), foram ainda adquiridos conhecimentos relativamente ao sistema propriamente dito, bem como no controlo dos parâmetros da qualidade da água.

Durante o decorrer do estágio foi proposto a realização de dois ensaios experimentais com o objetivo de avaliar a nutrição e alimentação de larvas de linguado senegalês. No primeiro ensaio foram testadas dietas de desmame com diferentes níveis de óleos marinhos e avaliado o crescimento e peso das larvas alimentadas com os diferentes tratamentos. Posteriormente, este ensaio foi prolongado, com larvas de maior tamanho, com o objetivo de testar a melhor dieta aferida no ensaio anterior, contra o grupo controlo, ou seja, o grupo alimentado com a dieta atualmente em uso na empresa. No primeiro ensaio foi observado que a dieta com menor inclusão de óleos marinhos foi a que resultou em melhores performances das larvas. Este ensaio levou à conclusão que a inclusão de óleos vegetais a níveis moderados leva a um maior crescimento das larvas e de juvenis de linguado, o que é benéfico na produção pois o custo das dietas é menos elevado e leva a uma produção mais sustentável.

O segundo ensaio teve como objetivo a avaliação de diferentes protocolos de alimentação no desmame de linguados. As larvas foram co-alimentadas com alimento vivo e uma dieta inerte a partir dos 2 DAH, ou seja, logo após a abertura da boca, num dos tratamentos, e a partir dos 15 DAH, no outro tratamento. Com este trabalho pode ser concluído que a co-alimentação iniciada após a metamorfose (15 DAH) é benéfica em termos de performance de crescimento, quando comparada com a co-alimentação

aos 2 DAH. Como tal este dado pode levar à diminuição dos custos de produção e à redução de trabalho da manutenção de alimento vivo, e ainda, a uma melhor adaptação das larvas ao alimento inerte, levando as larvas a crescerem mais, num menor período de tempo.

**Palavras-Chave:** Aquacultura, Safiestela, Sea8, linguado senegalês, *Solea senegalensis*, desmame, co-alimentação, dietas de desmame, crescimento, óleos de origem marinha, óleos de origem vegetal

# Abstract

In order to complete the Master of Aquatic Biological Resources, it was performed an internship at Safiestela - Sustainable Aqua Farming Investments Ltd, hatchery of sole (*Solea senegalensis*). This aquaculture starts its production with the manipulation of broodstock, to obtain eggs and end at the pre-ongrowing phase. Juveniles are then transported to the Aquacria, in Torreira, where it starts the ongrowing phase. These two units belong to Sea8 Group.

The internship held from September 11, 2014 to May 21, 2015, in which it was acquired knowledge in Senegalese sole production, such as the maintenance of broodstock, eggs, larvae and juvenile. It also was acquired knowledge in the maintenance of live fed, like artemia and rotifers. Once, part of the production, at this company, is done under recirculating aquaculture system (RAS), it was also acquired knowledge of the system and the control of the water parameters.

During the internship it was proposed the development of two experimental studies aimed to study some aspect of the nutrition and feeding of Senegalese sole larvae. On the first trial, the effect of different inclusion levels of marine oils in weaning diets on dry weight and the length of larvae were evaluated. Then, the best diet from the first trial was tested in a second trial and compared to the diet that has been used in the company, using larger larva. Based on the obtained results from these trials it can be concluded that the inclusion of moderated levels of vegetable oils lead to a higher growth performance of Senegalese sole larvae and juvenile, being beneficial in terms of sustainability and production profitability.

The aim of the second trial was to evaluate different feeding protocols, on the weaning of Senegalese sole. Larvae were co-fed with live and inert diets at 2 DAH, at the mouth opening (treatment 1), and at 15 DAH (treatment 2). Co-feeding before metamorphosis (15 DAH) lead to a higher growth rate of the larvae after the weaning is stablish. Following this protocol may lead to the reduction of the production cost as well as to the reduction of the need for production and maintenance of live feed production. This feeding protocol may allow a better adaptation of the larvae to inert diets, leading to higher growth rates.



**Key-Words:** Aquaculture, Safiestela, Sea8, Senegalese sole, *Solea senegalensis*, weaning, co-feeding, weaning diets, growth, marine sources oils, plant sources oils

# Índice

<b><i>Índice de Figuras .....</i></b>	<b><i>4</i></b>
<b><i>Índice de Tabelas e Gráficos.....</i></b>	<b><i>5</i></b>
<b><i>Lista de abreviaturas .....</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>I – Introdução .....</i></b>	<b><i>10</i></b>
<b>Aquacultura mundial.....</b>	<b>11</b>
<b>Aquacultura em Portugal.....</b>	<b>16</b>
<b>Aquacultura de <i>Solea senegalensis</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>Biologia da espécie <i>Solea senegalensis</i> .....</b>	<b>22</b>
<b><i>II - Estágio na Aquacultura Safiestela (Sustainable Aqua Farming Investments, Lda.).....</i></b>	<b><i>25</i></b>
<b>A empresa.....</b>	<b>26</b>
<b>Estágio .....</b>	<b>27</b>
<b>Estrutura da Safiestela .....</b>	<b>27</b>
Reprodutores .....	28
Sala de Incubação .....	30
Sala de Cultivo Larvar.....	32
Sala de Desmame .....	34
Sala de Rotíferos .....	36
Sala da Artémia .....	38
Sala da Pré-engorda.....	41
<b>Análises da qualidade da água da Empresa .....</b>	<b>42</b>
<b>Sistema de Recirculação em Aquacultura.....</b>	<b>42</b>
Remoção de Resíduos Sólidos.....	44
Remoção de Azoto .....	46
Controlo dos parâmetros da água.....	47
Desinfecção da água.....	48
<b><i>III – Ensaio 1: Avaliação de diferentes dietas de desmame para larvas de linguado senegalês (<i>Solea senegalensis</i>).....</i></b>	<b><i>49</i></b>

<b>Introdução .....</b>	<b>50</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>53</b>
1ª Parte.....	53
Cálculos.....	56
Análise estatística.....	57
2ª Parte.....	57
Análise estatística.....	58
<b>Resultados.....</b>	<b>58</b>
1º Parte.....	58
2ª Parte.....	65
<b>Discussão .....</b>	<b>70</b>
<b><i>IV – Ensaio 2: Avaliação de diferentes regimes alimentares de larvas de linguado senegalês (Solea senegalensis) .....</i></b>	<b><i>74</i></b>
<b>Introdução .....</b>	<b>75</b>
<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>78</b>
Análise Estatística .....	82
Cálculos.....	83
<b>Resultados.....</b>	<b>83</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>93</b>
<b><i>V – Conclusões .....</i></b>	<b><i>97</i></b>
<b><i>VI - Bibliografia .....</i></b>	<b><i>99</i></b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> <i>Solea senegalensis</i> .....	22
<b>Figura 2:</b> Mapa de distribuição do linguado senegalês .....	24
<b>Figura 3:</b> Fachada da empresa Safiestela .....	26
<b>Figura 4:</b> Diferentes salas dos reprodutores .....	29
<b>Figura 5:</b> Sala de incubação .....	31
<b>Figura 6:</b> Sala de desmame .....	34
<b>Figura 7:</b> Exemplar de cesta de triagem .....	36
<b>Figura 8:</b> Sala de rotíferos .....	37
<b>Figura 9:</b> Fêmeas de <i>B. plicatilis</i> .....	37
<b>Figura 10:</b> Macho e fêmea de <i>B. plicatilis</i> .....	37
<b>Figura 11:</b> Sala de Cultivo de Artémia .....	38
<b>Figura 12:</b> Artémia AF (Inve ®) .....	40
<b>Figura 13:</b> Artémia EG (Inve ®) .....	40
<b>Figura 14:</b> Sala da pré-engorda .....	41
<b>Figura 15:</b> Zona de tratamento da água .....	43
<b>Figura 16:</b> Biofiltro .....	45
<b>Figura 17:</b> Aspeto de um tanque utilizado no ensaio .....	53
<b>Figura 18:</b> Aspeto de um alimentador de tapete e forma de colocação da ração .....	54

# Índice de Tabelas e Gráficos

<b>Gráfico 1:</b> Pesca e Aquacultura Mundial .....	12
<b>Tabela 1:</b> Produção e utilização mundial de pesca e aquacultura .....	12
<b>Tabela 2:</b> Produção de Aquacultura por região: quantidade e percentagem da produção total mundial .....	13
<b>Tabela 3:</b> Aquacultura pelos 15 maiores produtores e principais grupos de espécies produzidas em 2012 .....	14
<b>Gráfico 2:</b> Produção em aquacultura interior e maricultura mundial .....	15
<b>Tabela 4:</b> Produção mundial de grupos de espécies de aquacultura interior e maricultura em 2012 .....	16
<b>Gráfico 3:</b> Produção de aquacultura em Portugal entre 2012 e 2013 .....	17
<b>Tabela 5:</b> Produção de aquacultura em águas interiores e oceânicas por tipo de água e regime, segundo as espécies .....	17
<b>Gráfico 4:</b> Estrutura do volume de produção em aquacultura por espécie.....	18
<b>Tabela 6:</b> Protocolo alimentar dos tratamentos experimentais .....	55
<b>Tabela 7:</b> Composição proximal das dietas experimentais .....	55
<b>Tabela 8:</b> Crescimento médio de cada tratamento aos 32, 45 e 70 DAH .....	59
<b>Gráfico 5:</b> Evolução do peso (mg de peso seco) dos diferentes tratamentos .....	59
<b>Gráfico 6:</b> Peso final dos linguados (mg de peso seco) aos 70 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	60
<b>Gráfico 7:</b> Evolução do comprimento (mm) dos diferentes tratamentos .....	60
<b>Gráfico 8:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 45 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	61
<b>Gráfico 9:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 70 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	61
<b>Tabela 9:</b> Número inicial de peixes de cada tanque .....	62

<b>Tabela 10:</b> Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos .....	62
<b>Gráfico 10:</b> Taxa de sobrevivência dos linguados para cada tratamento. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	63
<b>Gráfico 11:</b> Taxa de conversão alimentar (FCR) entre os diferentes tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	64
<b>Tabela 11:</b> Média da taxa de crescimento relativa (RGR; % day-1) de cada tratamento .....	64
<b>Gráfico 12:</b> Taxa de crescimento relativa (RGR; % day-1) entre os diferentes tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	64
<b>Tabela 12:</b> Crescimento de cada tratamento aos 71 e 90 DAH .....	65
<b>Gráfico 13:</b> Evolução do peso (mg de peso seco) dos diferentes tratamentos .....	65
<b>Gráfico 14:</b> Peso dos linguados (mg de peso seco) aos 90 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	66
<b>Gráfico 15:</b> Evolução do comprimento (mm) dos diferentes tratamentos .....	66
<b>Gráfico 16:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 90 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	67
<b>Tabela 13:</b> Número de peixes iniciais de cada tanque .....	67
<b>Gráfico 17:</b> Taxa de sobrevivência dos linguados para cada tratamento. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	68
<b>Tabela 14:</b> Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos .....	68
<b>Gráfico 18:</b> Taxa de conversão alimentar (FCR) entre os diferentes tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ) .....	69
<b>Gráfico 19:</b> Taxa de crescimento relativa (RGR; % dia-1) entre tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p<0.05$ ).....	69
<b>Tabela 15:</b> Média da taxa de crescimento relativa (RGR; % dia-1) das larvas de cada tratameto .....	70
<b>Tabela 16:</b> Introdução do alimento inerte de cada tratamento .....	78
<b>Tabela 17:</b> Composição proximal da dieta G4 utilizada no ensaio .....	79

<b>Tabela 18:</b> Quantidade de alimento vivo e inerte fornecido em cada tratamento até aos 14 DAH .....	80
<b>Tabela 19:</b> Quantidade de alimento vivo e inerte fornecido em cada tratamento até aos 31 DAH .....	81
<b>Tabela 20:</b> Crescimento médio dos linguados submetidos aos diferentes protocolos alimentares aos 2, 15, 25, 32, 45 e 61 DAH .....	84
<b>Gráfico 20:</b> Evolução do peso (mg de peso seco) dos diferentes tratamentos .....	84
<b>Gráfico 21:</b> Peso dos linguados (mg de peso seco) aos 15 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	85
<b>Gráfico 22:</b> Peso dos linguados (mg de peso seco) aos 25 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	85
<b>Gráfico 23:</b> Peso dos linguados (mg de peso seco) aos 32 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	86
<b>Gráfico 24:</b> Peso dos linguados (mg de peso seco) aos 45 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	86
<b>Gráfico 25:</b> Peso dos linguados (mg de peso seco) aos 61 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	86
<b>Gráfico 26:</b> Evolução do comprimento (mm) dos diferentes tratamentos .....	87
<b>Gráfico 27:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 15 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	88
<b>Gráfico 28:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 25 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	88
<b>Gráfico 29:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 32 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	88
<b>Gráfico 30:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 45 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	89
<b>Gráfico 31:</b> Comprimento dos linguados (mm) aos 61 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....	89
<b>Tabela 21:</b> Número inicial de peixes por cada tanque .....	90
<b>Tabela 22:</b> Quantidade média de peixes pequenos e grandes de cada tratamento .....	90

**Tabela 23:** Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos .....91

**Gráfico 32:** Taxa de sobrevivência dos linguados para cada tratamento. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....91

**Gráfico 33:** Taxa de conversão alimentar (FCR) entre os tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....92

**Tabela 24:** Média da taxa de crescimento relativo (RGR, % dia-1) de cada tratamento.....92

**Gráfico 34:** Taxa de crescimento relativa (RGR, % dia-1) entre tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ) .....92



## Lista de abreviaturas

**ALA:** Ácido  $\alpha$ -linolénico

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**DAH:** Dias após eclosão

**DHA:** Ácido docosahexaenóico

**EPA:** Ácido eicosapentanóico

**FCR:** Taxa de conversão alimentar

**LC-HUFA:** Ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa

**LOA:** Ácido linoleico

**MUFA:** Ácidos gordos monoinsaturados

**O<sub>2</sub>:** Oxigénio

**O<sub>3</sub>:** Ozono

**PUFA:** Ácidos gordos polinsaturados

**RAS:** Sistema de recirculação em aquacultura

**RGR:** Taxa de crescimento relativa

**UV:** Ultravioleta

**$\mu\text{m}$ :** micrómetro

## I – Introdução

## Aquacultura mundial

O consumo de peixe tem vindo a aumentar em todo o mundo (Pinho et al., 2011), dado o seu elevado valor nutricional, sendo considerado uma fonte de proteínas de elevado valor biológico, rico em vitaminas do complexo B e minerais como o iodo, o fósforo, o sódio, o potássio, o ferro e o cálcio. O óleo de peixe, rico em ácidos gordos insaturados, é considerado de melhor qualidade nutricional do que o da carne vermelha, rica em ácidos gordos saturados, o que lhe confere alguns benefícios para a saúde humana (FAO, 2015). O aumento do consumo de pescado tem colocado uma grande pressão na exploração dos recursos marinhos, o que se reflete, muitas vezes, na sobre-exploração de alguns recursos pesqueiros (Pinho et al., 2011). Esta sobre-exploração dos recursos naturais marinhos conduziu à escassez e, nalguns casos, ao desaparecimento de algumas espécies, sendo necessário recorrer a alternativas que colmatem a diminuição dos produtos provenientes da pesca, de forma a satisfazer as necessidades humanas a nível mundial. A aquacultura surge, assim, como uma atividade que atenua estas carências, assumindo uma importância cada vez maior no panorama de fornecimento alimentar mundial (FAO, 2014).

A aquacultura é definida como a produção, em ambientes controlados, de animais ou plantas aquáticas, sendo necessária a intervenção humana de forma a aumentar, para além das capacidades naturais do meio, a produção desses organismos. A aquacultura pretende aumentar a produção através da alimentação artificial, no caso da produção intensiva e semi-intensiva; e a integração com outras espécies, no caso da aquacultura multi-trófica integrada (Mestre, 2008). Este sector de produção alimentar é o que demonstra maior crescimento, sendo responsável por, praticamente, 50% do pescado consumido a nível mundial (FAO, 2015).

Como se verifica no Gráfico 1 e na Tabela 1, a produção mundial de pescado tem verificado um aumento constante ao longo das últimas cinco décadas, no qual se observa um aumento do consumo de peixe a uma taxa média anual de 3,2%, suplantando o crescimento populacional em 1,6%. A aquacultura de águas interiores demonstra maior produção relativamente à marinha, verificando-se uma taxa de crescimento superior. Salienta-se, ainda, o aumento do consumo mundial *per capita* de peixe que em 2012 foi de 19,2 kg (FAO, 2014).

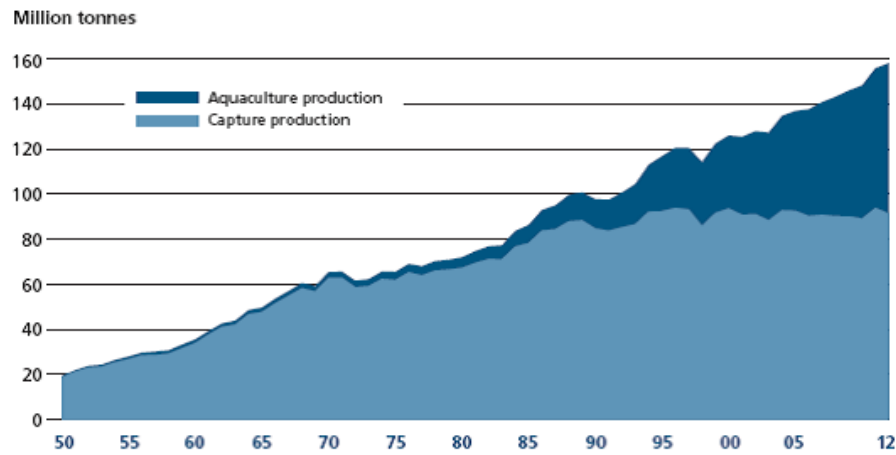


Gráfico 1 - Pesca e Aquacultura Mundial (FAO, 2014)

Tabela 1 - Produção e utilização mundial de pesca e aquacultura (FAO, 2014)

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>(Million tonnes)</i>						
<b>PRODUCTION</b>						
<b>Capture</b>						
Inland	10.1	10.3	10.5	11.3	11.1	11.6
Marine	80.7	79.9	79.6	77.8	82.6	79.7
<b>Total capture</b>	<b>90.8</b>	<b>90.1</b>	<b>90.1</b>	<b>89.1</b>	<b>93.7</b>	<b>91.3</b>
<b>Aquaculture</b>						
Inland	29.9	32.4	34.3	36.8	38.7	41.9
Marine	20.0	20.5	21.4	22.3	23.3	24.7
<b>Total aquaculture</b>	<b>49.9</b>	<b>52.9</b>	<b>55.7</b>	<b>59.0</b>	<b>62.0</b>	<b>66.6</b>
<b>TOTAL WORLD FISHERIES</b>	<b>140.7</b>	<b>143.1</b>	<b>145.8</b>	<b>148.1</b>	<b>155.7</b>	<b>158.0</b>
<b>UTILIZATION<sup>1</sup></b>						
Human consumption	117.3	120.9	123.7	128.2	131.2	136.2
Non-food uses	23.4	22.2	22.1	19.9	24.5	21.7
Population ( <i>billions</i> )	6.7	6.8	6.8	6.9	7.0	7.1
Per capita food fish supply ( <i>kg</i> )	17.6	17.9	18.1	18.5	18.7	19.2

Note: Excluding aquatic plants. Totals may not match due to rounding.

<sup>1</sup> Data in this section for 2012 are provisional estimates.

Verifica-se um maior consumo de peixe nos países em desenvolvimento comparativamente aos países desenvolvidos, contudo essa diferença que outrora foi muito evidenciada, está a diminuir. Esta situação deve-se ao crescente consumo e importação de peixes por parte dos países desenvolvidos, uma vez que os produtos da pesca já não são suficientes para alimentar toda a população, enquanto os países em desenvolvimento mantêm o mesmo consumo de peixe. Principalmente nos países em desenvolvimento, o pescado pode ser considerado um componente nutricional

essencial, uma vez que o consumo de outros tipos de proteína animal é, muitas vezes, reduzido (FAO, 2014).

Em 2012, a produção aquícola mundial atingiu o recorde histórico de 90,4 milhões de toneladas de peso vivo, dos quais 66,6 milhões de toneladas pertencem a pescado produzidos para a alimentação humana e 23,8 milhões de toneladas a algas aquáticas. Entre 2000 e 2012, a produção mundial de peixes em aquacultura registou uma taxa de expansão média anual de 6,2%, no entanto verifica-se um decréscimo na produção média anual, que nos períodos de 1980-1990 e 1990- 2000 registou taxas de 10,8% e de 9,5%, respetivamente (FAO, 2014).

Relativamente à produção aquícola por região (Tabela 2) observou-se um crescimento mais rápido, no início de 2000, em África, na América Latina e nas Caraíbas. A China é o maior produtor mundial, aumentando a sua cota de produção de aproximadamente 50% em 1990, para 61,7%, em 2012. Excluindo a China, a Ásia registou um aumento na taxa de produção aquícola de 8,2%, entre o período de 2000 a 2012, sendo bastante superior aos restantes períodos. Cabe à Europa e à Oceânia as taxas mais pequenas de produção aquícola, as quais cresceram cerca de 2.9% e 3.5%, respetivamente, entre 2000 e 2012. Com estes dados, verifica-se que a aquacultura tem uma distribuição desigual, pois a Ásia representa 88% da produção global por volume (FAO, 2014).

Tabela 2 - Produção de Aquacultura por região: quantidade e percentagem da produção total mundial (FAO, 2014)

Selected groups and countries		1990	1995	2000	2005	2010	2012
Africa	(tonnes)	81 015	110 292	399 688	646 182	1 286 591	1 485 367
	(percentage)	0.62	0.45	1.23	1.46	2.18	2.23
North Africa	(tonnes)	63 831	75 316	343 986	545 217	928 530	1 030 675
	(percentage)	0.49	0.31	1.06	1.23	1.57	1.55
Sub-Saharan Africa	(tonnes)	17 184	34 976	55 702	100 965	358 062	454 691
	(percentage)	0.13	0.14	0.17	0.23	0.61	0.68
Americas	(tonnes)	548 479	919 571	1 423 433	2 176 740	2 581 089	3 187 319
	(percentage)	4.19	3.77	4.39	4.91	4.37	4.78
Caribbean	(tonnes)	12 169	28 260	39 704	29 790	37 301	28 736
	(percentage)	0.09	0.12	0.12	0.07	0.06	0.04
Latin America	(tonnes)	179 367	412 650	799 234	1 478 443	1 885 965	2 565 107
	(percentage)	1.37	1.69	2.47	3.34	3.19	3.85
North America	(tonnes)	356 943	478 661	584 495	668 507	657 823	593 476
	(percentage)	2.73	1.96	1.80	1.51	1.11	0.89
Asia	(tonnes)	10 801 531	21 677 062	28 420 611	39 185 417	52 436 025	58 895 736
	(percentage)	82.61	88.90	87.67	88.46	88.82	88.39
China	(tonnes)	6 482 402	15 855 653	21 522 095	28 120 690	36 734 215	41 108 306
	(percentage)	49.58	65.03	66.39	63.48	62.22	61.69
Central and Western Asia	(tonnes)	72 164	65 602	122 828	190 654	259 781	311 133
	(percentage)	0.55	0.27	0.38	0.43	0.44	0.47
Southern and Eastern Asia (excluding China)	(tonnes)	4 246 965	5 755 807	6 775 688	10 874 073	15 442 028	17 476 296
	(percentage)	32.48	23.61	20.90	24.55	26.16	26.23
Europe	(tonnes)	1 601 649	1 581 359	2 052 567	2 137 340	2 548 094	2 880 641
	(percentage)	12.25	6.49	6.33	4.83	4.32	4.32
European Union (Member Organization) (28)	(tonnes)	1 033 857	1 182 098	1 400 667	1 269 958	1 280 236	1 259 971
	(percentage)	7.91	4.85	4.32	2.87	2.17	1.89
Other European countries	(tonnes)	567 792	399 261	651 900	867 382	1 267 858	1 620 670
	(percentage)	4.34	1.64	2.01	1.96	2.15	2.43
Oceania	(tonnes)	42 005	94 238	121 482	151 466	185 617	184 191
	(percentage)	0.32	0.39	0.37	0.34	0.31	0.28
World	(tonnes)	13 074 679	24 382 522	32 417 781	44 297 145	59 037 416	66 633 253

Em 2012, somente 15 países foram responsáveis por um total de 92,7% da produção mundial de pescado para consumo (Tabela 3). Destes, destacam-se o Chile, o Egito e o Brasil que registaram um forte aumento da sua produção aquícola. A Índia, o Bangladesh, o Egito, o Mianmar e o Brasil centraram a produção maioritariamente em águas interiores. Pelo contrário, na Noruega a produção aquícola é maioritariamente em água salgada (maricultura), incidindo na produção de salmão do Atlântico, em jangadas. No Chile, a produção principal é a de moluscos e de peixes de água doce, direcionados para a exportação. A principal produção da Tailândia é de camarão. Na Indonésia produz-se peixes em aquaculturas costeiras de água salobra, nas Filipinas produz-se maioritariamente peixes e uma pequena percentagem de moluscos e crustáceos, e no Vietname metade da produção total diz respeito à produção de *Pangasius bagre*, de elevado valor a nível de exportação, sendo que o resto da sua produção centra-se na cultura de camarão marinho e de água doce (FAO, 2014).

Tabela 3 - Aquacultura pelos 15 maiores produtores e principais grupos de espécies produzidas em 2012 (FAO, 2014)

Producer	Finfish		Crustaceans	Molluscs	Other species	National total	Share in world total
	Inland aquaculture	Mariculture					
	(Tonnes)						(Tonnes)
China	23 341 134	1 028 399	3 592 588	12 343 169	803 016	41 108 306	61.7
India	3 812 420	84 164	299 926	12 905	...	4 209 415	6.3
Viet Nam	2 091 200	51 000	513 100	400 000	30 200	3 085 500	4.6
Indonesia	2 097 407	582 077	387 698	...	477	3 067 660	4.6
Bangladesh	1 525 672	63 220	137 174	...	...	1 726 066	2.6
Norway	85	1 319 033	...	2 001	...	1 321 119	2.0
Thailand	380 986	19 994	623 660	205 192	4 045	1 233 877	1.9
Chile	59 527	758 587	...	253 307	...	1 071 421	1.6
Egypt	1 016 629	...	1 109	...	...	1 017 738	1.5
Myanmar	822 589	1 868	58 981	...	1 731	885 169	1.3
Philippines	310 042	361 722	72 822	46 308	...	790 894	1.2
Brazil	611 343	...	74 415	20 699	1 005	707 461	1.1
Japan	33 957	250 472	1 596	345 914	1 108	633 047	1.0
Republic of Korea	14 099	76 307	2 838	373 488	17 672	484 404	0.7
United States of America	185 598	21 169	44 928	168 329	...	420 024	0.6
Top 15 subtotal	36 302 688	4 618 012	5 810 835	14 171 312	859 254	61 762 101	92.7
Rest of world	2 296 562	933 893	635 983	999 426	5 288	4 871 152	7.3
World	38 599 250	5 551 905	6 446 818	15 170 738	864 542	66 633 253	100

Apesar da aquacultura mundial manter-se relativamente forte, tem-se verificado que a produção aquícola em alguns países, como os Estados Unidos da América, a Espanha, a França, a Itália, o Japão e a Coreia do Sul tem vindo a diminuir. Tal acontece, não só devido ao preço de manutenção das aquaculturas nestes locais, como pela facilidade de importação, a um preço baixo, de produtos provenientes de aquaculturas de outros locais, onde a produção é extremamente barata. Assim, países

com produções menos dispendiosas dedicaram-se à produção de espécies de interesse de outros locais, com o objetivo de exportação de pescado (FAO, 2014).

A aquacultura pode ser dividida em aquacultura de águas interiores (normalmente realizada com água doce, contudo existem produções salinas, situadas em áreas do interior, e produções salobras) e maricultura, que engloba as produções realizadas no mar e zonas entre marés, além das produções terrestres em meios intensivos que utilizam água salgada. Estes dois tipos de produção, em 1980, estavam ao mesmo nível, todavia a aquacultura interior tem aumentado ao longo dos anos (Gráfico 2) com uma taxa de crescimento anual de 9,2%, o que contribui com 63% do total de produção aquícola para consumo em 2012 (FAO, 2014).

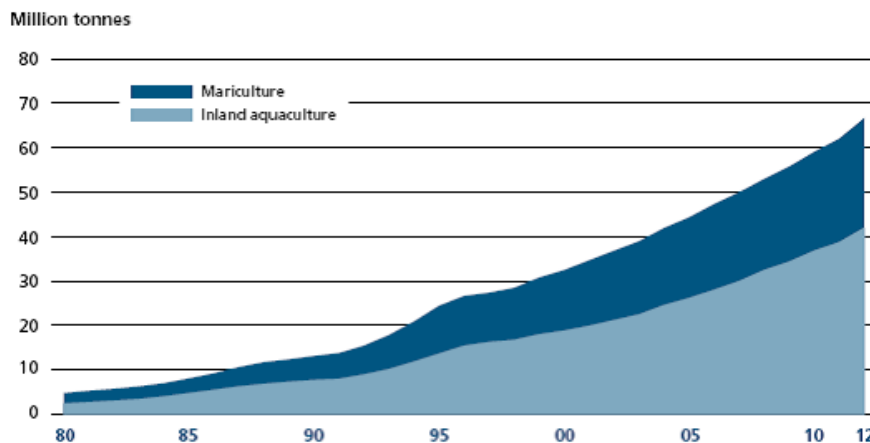


Gráfico 2 - Produção em aquacultura interior e maricultura mundial (FAO, 2014)

Em 2012, a produção em aquacultura incidiu maioritariamente na produção de peixes ósseos e moluscos, totalizando 66,3% e 22,8% da produção total, o que corresponde, respetivamente, a 44,2 e 15,2 milhões de toneladas, de um total de 66,6 milhões de toneladas de alimento produzido. Relativamente à produção de peixes ósseos, 38,6 milhões dizem respeito à produção em águas interiores, ao contrário da produção de crustáceos e moluscos que é desenvolvida, principalmente, em água salgada. Embora a produção de moluscos seja mais do dobro da de crustáceos (6,4 milhões de toneladas), o lucro da produção dos primeiros foi metade da dos crustáceos. Tal deve-se à produção de moluscos ser realizada somente com a finalidade de produção de pérolas em culturas na Ásia e ao fato de grande parte dos crustáceos possuírem elevado valor comercial relativamente aos moluscos (Tabela 4) (FAO, 2014).

Tabela 4 - Produção mundial de grupos de espécies de aquacultura interior e maricultura em 2012 (FAO, 2014)

	Inland aquaculture	Mariculture	Quantity subtotal		Value subtotal	
	(Million tonnes)	(Million tonnes)	(Million tonnes)	(Percentage by volume)	(US\$ million)	(Percentage by value)
Finfish	38.599	5.552	44.151	66.3	87 499	63.5
Crustaceans	2.530	3.917	6.447	9.7	30 864	22.4
Molluscs	0.287	14.884	15.171	22.8	15 857	11.5
Other species	0.530	0.335	0.865	1.3	3 512	2.5
<b>Total</b>	<b>41.946</b>	<b>24.687</b>	<b>66.633</b>	<b>100</b>	<b>137 732</b>	<b>100</b>

## Aquacultura em Portugal

A aquacultura aparenta ter sido introduzida na Península Ibérica pelos Romanos e, desde esses tempos, a aquacultura em Portugal tem sido associada às saliniculturas, que representam salinas adaptadas, funcionando como reservatórios para o crescimento dos organismos aquáticos (Cassamo, 2012). Inicialmente a aquacultura era dominada pela aquacultura em regime semi-intensivo ou extensivo, embora atualmente a aquaculturas intensiva seja a mais prevalente. A localização geográfica de Portugal, com uma grande extensão marinha, o Oceano Atlântico, e a proximidade com o mar Mediterrâneo proporcionam um potencial único na atividade aquícola e no desenvolvimento de espécies de interesse comercial (Branco, 2003; Cassamo, 2012; Gomes, 2012; Matusse, 2012).

Em 2013, a aquacultura portuguesa produziu 9955 toneladas gerando uma receita de 54 milhões de euros (Gráfico 3). A aquacultura em Portugal incide maioritariamente na produção marinha, com um total de 95,4%, sendo a aquacultura de água doce uma parcela muito mais pequena (Guillen et al., 2013; INE, 2015). Em 2013, a produção mais importante era a de peixes cultivados em águas salobras ou marinhas, representando 92% da produção portuguesa (Tabela 5). Os peixes corresponderam a 41,9% da produção em águas salobras e marinhas, sendo a dourada e o pregado responsáveis por 85% do peixe produzido, embora o robalo e o linguado também contribuam para a produção total. Entre 2012 e 2013, verificou-se uma redução de 9% da quantidade produzida, contudo as receitas aumentaram 3,1% (Gráfico 3). Esta redução no nível da produção é maioritariamente atribuída à diminuição da produção de pregado, em cerca de 46,6% (Tabela 5 e Gráfico 4) (INE, 2015).



Cabe aos moluscos bivalves 50% da produção total, ou seja englobando a produção marinha, salobra e de água doce, sendo a ameijoia a espécie mais produzida, seguida do mexilhão (que duplicou a sua produção relativamente ao ano anterior) e das ostras japonesas (Gráfico 4) (INE, 2015).

Em 2012, a aquacultura em águas doce foi, na sua totalidade, realizada em sistema intensivo, como é o caso da produção de truta arco-íris e comum (Tabela 5). Relativamente à produção em água marinha e salobra, contaram 54,7% de produção é realizada em sistema extensivo, produzindo, maioritariamente bivalves. O regime intensivo representa 34,7% da totalidade de produção, enquanto o regime semi-intensivo foi responsável por 10,7% (INE, 2015).

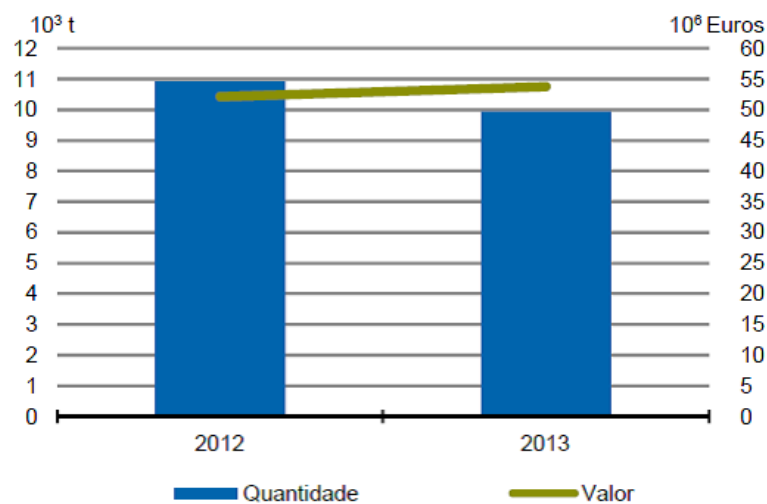


Gráfico 3 - Produção de aquacultura em Portugal entre 2012 e 2013 (INE, 2015)

Tabela 5 - Produção de aquicultura em águas interiores e oceânicas por tipo de água e regime, segundo as espécies (INE, 2015)

Principais espécies		Águas doces, salobras e marinhas							
		Total		Extensivo		Intensivo		Semi-intensivo	
		t	1000 Euros	t	1000 Euros	t	1000 Euros	t	1000 Euros
Portugal	2012 Rv	10 939	52 181	4 472	22 057	1 540	5 924	4 927	24 199
	2013	9 955	53 796	5 018	28 746	3 954	18 804	982	6 246
Águas doces		772	1 897	0	0	772	1 897	0	0
Truta arco-íris		771	1 890	0	0	771	1 890	0	0
Truta comum		1	7	0	0	1	7	0	0
Águas salobras e marinhas		9 183	51 899	5 018	28 746	3 182	16 908	982	6 246
Peixes		4 171	23 088	31	176	3 182	16 908	958	6 004
Corvina		5	25	0	0	5	24	e	1
Dourada		1 201	6 036	25	139	632	2 630	543	3 267
Linguado		154	2 035	1	7	150	1 975	4	53
Pregado		2 353	12 078	0	0	2 353	12 078	0	0
Robalo		455	2 902	4	25	42	200	409	2 677
Outros		2	12	1	5	0	0	1	7
Moluscos e Crustáceos		5 012	28 812	4 987	28 570	0	0	25	242
Amêijoas (q)		2 372	25 283	2 351	25 049	0	0	21	234
Mexilhões nep		1 547	961	1 547	961	0	0	0	0
Ostra japonesa		837	2 173	837	2 173	0	0	e	e
Ostra portuguesa (q)		158	312	157	309	0	0	1	3
Outros		98	84	95	78	0	0	3	5

(q) Espécies de regime extensivo, produzidas em pisciculturas de tipo misto (extensivo e semi-intensivo) classificadas como semi-intensivas em função do regime de produção predominante.

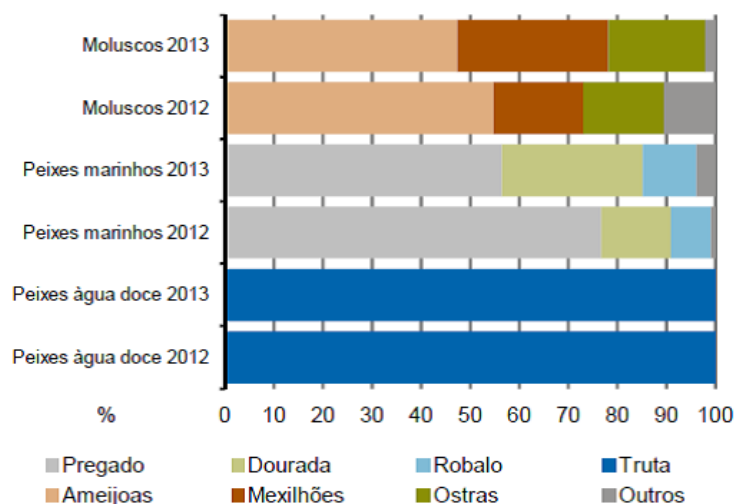


Gráfico 4 - Estrutura do volume de produção em aquacultura por espécie (INE, 2015)

Salienta-se que apesar de existirem fatores naturais favoráveis à aquacultura em Portugal, não se tem verificado um crescimento como o que seria de esperar (Cassamo, 2012). Por esse motivo, no início de 2013, a Ministra da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, Assunção Cristas, afirmou que: “Portugal pode duplicar a produção de aquacultura até 2015”, salientando que este “é um dos caminhos para compensar o consumo nacional de peixe, três vezes superior à média europeia” (Portuguesa, 2013).

## Aquacultura de *Solea senegalensis*

Em Portugal, a produção de linguado senegalês iniciou-se extensivamente, em tanques de terra, ao longo da costa sul portuguesa e espanhola (Blanco-Vives et al., 2010; Dinis et al., sem data; Dinis et al., 1999; Gomes, 2012; Morais et al., 2014). No entanto, a saturação do mercado devido à elevada produção aquícola da dourada (*Sparus aurata*) e do robalo (*Dicentrarchus labrax*), espécies também produzidas em Portugal, a procura de novas espécies, com potencial para a aquacultura, tornou-se urgente (Dinis et al., sem data; Dinis et al., 1999).

A produção de *Solea senegalensis* é considerada uma espécie altamente promissora na aquacultura europeia, principalmente na região do Mediterrâneo (Imsland et al., 2003; Gomes, 2012; Marinho et al., 2012; Matusse, 2012), pelo que tem sido alvo de estudo em Portugal e Espanha desde o início da época de 80 (Cañavate, 2005; Dinis

et al., 1999; Dinis et al., sem data), verificando-se avanços importantes para a produção intensiva desta espécie (Marinho et al., 2012).

O linguado é um produto com um preço elevado no mercado (Gavaia et al., 2002) comparativamente a outras espécies produzidas em Portugal, ou seja, 3 vezes superior ao preço do robalo e da dourada e 1,5 vezes superior ao pregado (Dinis et al., sem data; Morais et al., 2014). Quanto à taxa de crescimento, em culturas extensivas, o linguado cresce mais que o robalo, ficando atrás no crescimento relativamente à dourada (Dinis et al., sem data).

Inicialmente existiu um grande insucesso do desenvolvimento comercial de *Solea senegalensis*, devido à elevada incidência de doenças (Imsland et al., 2003; Morais et al., 2014), nomeadamente flexibacteriose e pasteurolose, verificando-se que estes surtos patológicos eram mais evidentes a temperaturas superiores a 22 °C (Morais et al., 2014), bem como quando eram fornecidas dietas nutricionalmente pobres (Imsland et al., 2003). Todavia, tem-se verificado uma evolução, embora lenta, sobre o conhecimento científico e técnico deste cultivo, uma vez que existem vários entraves, nomeadamente no desmame e no crescimento dos juvenis (Gomes, 2012; Imsland et al., 2003; Marinho et al., 2012), nas quais a alimentação é o fator mais importante (Marinho et al., 2012). Outros entraves ao cultivo referem-se à pigmentação anormal e malformações que ocorrem aquando da metamorfose (Dinis et al., 1999; Morais et al., 2014).

A produção intensiva de linguado senegalês tem vindo a apresentar, ao longo dos últimos anos, enormes avanços, graças a uma melhor gestão das práticas e técnicas de produção. Tal reflete-se no aumento de produtividade, intrinsecamente ligado a uma maior facilidade em se conseguir realizar o cultivo larvar e consequentemente o crescimento rápido das larvas, com elevadas taxas de sobrevivência (Cañavate, 2005; Blanco-Vives et al., 2010; Morais et al., 2014), o que leva ainda mais ao aumento do interesse na produção desta espécie (Imsland et al., 2003; Morais et al., 2014). Todavia, será ainda necessário afinar as técnicas de produção, ao longo de todo o ciclo produtivo de forma a atingir uma produção favorável e sustentável (Blanco-Vives et al., 2010). De fato, o conhecimento científico em diversas áreas como a nutrição, a alimentação, o potencial de crescimento e as condições ambientais ótimas à produção do linguado ainda é relativamente diminuto. Isto traz implicações para um adequado planeamento da produção em aquacultura, com consequências a nível de custo de produção e do desenvolvimento sustentável da fileira (Morais et al., 2014).

Com o desenvolvimento do RAS (do inglês *Recirculating Aquaculture Systems*), as pisciculturas da Península Ibérica que têm como objetivo a produção desta espécie, implementaram este sistema, na medida em que há um melhor controlo da temperatura e da gestão da qualidade da água. Este desenvolvimento tecnológico impulsionou a produção de linguado, visto ser uma espécie muito sensível a mudanças da qualidade da água (Imslund et al., 2003; Morais et al., 2014). Como tal, a cultura intensiva de linguado senegalês tem sido estimulada tanto em Portugal como em Espanha (Boglino et al., 2012).

Em aquacultura intensiva de linguado, principalmente em sistemas RAS, as condições de cultura, nomeadamente as condições de temperatura, de fotoperíodo e de densidade dos linguados, são elementos chave para a otimização da produção desta espécie, bem como do controlo das desovas (Morais et al., 2014).

Uma vez que se trata de uma espécie ectotérmica, a temperatura é um fator que influencia o crescimento do linguado (Imslund et al., 2003; Blanco-Vives et al., 2010; Guerreiro et al., 2012, 2014) e o seu desenvolvimento larvar (Blanco-Vives et al., 2010). Durante a fase larvar, variações da temperatura, para além do intervalo tolerado pela espécie, pode afetar sobrevivência e levar ao aparecimento de malformações (Dionísio et al., 2012). Normalmente a variação da temperatura para a incubação e cultivo larvar está entre os 18 e os 22 °C. Daí, o estudo realizado por Dionísio et al. (2012) demonstrar que diferentes temperaturas levaram a diferenças no crescimento das larvas. Desta forma, quando as larvas foram expostas a temperaturas inferiores a 18 °C, o seu crescimento foi inferior. Este estudo verificou, ainda, que a temperatura de incubação influencia as anormalidades nas larvas após a eclosão, levando à conclusão que a qualidade das larvas era superior, no que respeita ao crescimento e incidência de deformações, quando os ovos eram incubados a 18 °C e o cultivo larvar era realizado a 21 °C.

A manipulação do fotoperíodo é um fator deveras importante para a otimização da produção intensiva de linguado senegalês (Bayarri et al., 2004), visto ser uma espécie caracterizada pela sua atividade noturna, nomeadamente uma maior locomoção e alimentação no início da fase escura e, durante esta fase, uma maior taxa metabólica (Marinho et al., 2012; Morais et al., 2012). Em produção intensiva, a adequação da estratégia alimentar tendo em conta as fases de maior atividade metabólica, podem traduzir-se no aumento do crescimento e da eficiência alimentar (Marinho et al., 2012). Dada a importância deste tópico, são vários os estudos realizados até à data com o intuito de otimizar o fotoperíodo para cada uma das fases do ciclo de vida. Um estudo

realizado por Bayarri et al. (2004), demonstrou que durante um fotoperíodo de 12:12 se verifica a atividade noturna de *Solea senegalensis*, embora tal não seja bem definido em todos os peixes do ensaio. Verificou-se ainda, que a atividade era máxima na primeira parte da fase escura, todavia ia decrescendo ao longo desta fase. Como tal, é necessário ter em conta esta situação quando se efetua a estratégia alimentar desta espécie, na medida em que quando estes são alimentados durante a fase preferencial, verifica-se um maior crescimento devido ao aumento da eficiência alimentar (Marinho et al., 2012). Marinho et al. (2012) verificaram que o crescimento de indivíduos somente alimentados à noite era menor, existindo ainda um aumento da excreção de amónia, quando comparado com peixes alimentados durante o dia. Cañavate et al. (2006) estudou o fotoperíodo preferencial das larvas, concluindo que as larvas pelágicas até aos 8 DAH (dias após a eclosão) procedem à captura das presas vivas, quando os tanques se encontram iluminados, contudo aos 9-10 DAH dá-se uma fase de transição, na medida em que o número de presas capturadas durante a fase escura aumenta. Desta forma, verifica-se que a preferência alimentar na fase escura é algo que aparece numa fase inicial do desenvolvimento do linguado senegalês. Quanto ao espectro de luz, as larvas parecem ter uma resposta positiva à luz azul ( $\lambda = 435 - 500 \text{ nm}$ ), o que se traduz no eficiente desenvolvimento das larvas (Blanco-Vives et al., 2010).

Numa aquacultura intensiva, um dos fatores importantes que influencia o crescimento dos indivíduos e o seu bem-estar é a densidade de *stock* (Salas-Leiton et al., 2008; Sánchez et al., 2010). O linguado é uma espécie que tolera elevadas densidades de produção, não se verificando hierarquias baseadas em tamanho aquando da alimentação (Salas-Leiton et al., 2008). No entanto, densidades acima do tolerável pela espécie pode induzir *stress* contudo, sem nenhum tipo de violência entre os peixes, não estando comprovado se este aumento de *stress* é devido à densidade em si ou ao aumento da deterioração da qualidade de água (Sofia Morais et al., 2014). O efeito do aumento da densidade de cultivo no crescimento e taxa de alimentação em juvenis foi estudada por Salas-Leiton et al. (2008). Neste estudo, a ingestão de alimento foi superior quando a densidade aumentou para 30 kg/m<sup>2</sup>, observando-se um tempo de resposta mais curto ao fornecimento de ração quando nestas condições, comparativamente a densidades de 2, 7 e 15 kg/m<sup>2</sup>. No que respeita à dispersão de tamanhos e ao crescimento, não se verificou que tivessem sido afetados pelo aumento de densidade.

Com todos os avanços realizados para o aumento de conhecimento de produção desta espécie, como descrito acima, já é possível desenvolver esta espécie desde a

desova de reprodutores selvagens, até ao tamanho comercial (Cañavate, 2005; Imsland et al., 2003).

## Biologia da espécie *Solea senegalensis*

O linguado senegalês (*Solea senegalensis*) pertence à classe dos Actinopterygii, à ordem Pleuronectiformes, à família Soleidae e ao género *Solea* (Figura 1) (Andrade, 2012; FishBase, 2015; Matusse, 2012; Villanueva et al., 2014). É um peixe plano (Blanco-Vives et al., 2010; Cañavate et al., 2006; Dinis 1992; Dinis et al., sem data; Dinis et al., 1999; Imsland et al., 2003; Villanueva et al., 2014) e apresenta um corpo oval e assimétrico, sendo que os olhos se encontram sempre do lado direito. A cabeça é redonda e pouco saliente, a boca é pequena em forma arqueada e semicircular que chega à parte inferior do olho direito e não possui dentes. Relativamente às mandíbulas, a superior apresenta-se mais desenvolvida que a inferior (Andrade, 2012; Matusse, 2012; Villanueva et al., 2014; FishBase, 2015).



Figura 1 - *Solea senegalensis* (Sea8, 2015)

Esta espécie é gonocórica (Dinis et al., 1999; Branco, 2003; Andrade, 2012) e ovípara com a fertilização externa dos ovos (Branco, 2003; Gomes, 2012; Villanueva et al., 2014). Segundo vários autores, a primeira maturação das fêmeas dá-se, aproximadamente, aos 3 anos de idade (Andrade, 2012; Gomes, 2012; Dinis et al., 1999), embora Dinis et al. (sem data) refiram que a maturação ocorre aos 2 anos, mas todos os autores salientam que esta maturação se dá quando o comprimento total da fêmea é de 32 cm. A época de desova do linguado senegalês estende-se desde

Março/Abril até Junho, ou seja, durante a primavera, quando há um aumento da temperatura (Dinis, 1992; Dinis et al., sem data; Dinis et al., 1999; Branco, 2003; Imsland et al., 2003; Andrade, 2012; Gomes, 2012; Villanueva et al., 2014), conseguindo produzir 509 oócitos/g de peixe (Dinis et al., sem data; Dinis et al., 1999; Andrade, 2012; Villanueva et al., 2014). Existe, também, um período de desova secundário que ocorre no Outono, nomeadamente entre Outubro e Dezembro (Cañavate, 2005; Morais et al., 2014). A cor da parte superior do manto é acastanhada e pode modificar-se, uma vez que estes indivíduos apresentam mimetismo (Matusse, 2012; Villanueva & Alonso, 2014).

No que diz respeito à alimentação têm preferência por invertebrados pequenos (Gomes, 2012; Matusse, 2012; Villanueva et al., 2014), larvas de quiromídeos e pequenos crustáceos (Gomes, 2012), embora consigam resistir a longos períodos de fome (Matusse, 2012). Como o seu estômago é pouco desenvolvido, necessitam de se alimentar frequentemente (Gomes, 2012).

Como se observa na Figura 2, esta espécie distribui-se desde o Senegal até ao Golfo da Biscaia, sendo comum no Mediterrâneo e na parte sul do Atlântico (Dinis e Reis (sem data); Dinis et al., 1999; Branco, 2003; Andrade, 2012; Gomes, 2012; Matusse, 2012; Villanueva et al., 2014; FishBase, 2015), daí serem espécies adaptadas a climas quentes (Andrade, 2012; Dinis, 1992; Dinis et al., 1999; Matusse, 2012), com temperaturas compreendidas entre os 20 e os 21 °C (Blanco-Vives et al., 2010; Villanueva et al., 2014). Além disso, os exemplares adultos desta espécie encontram-se a profundidades entre os 80 a 100 m (Branco, 2003; Gomes, 2012; Matusse, 2012), em águas marinhas próximas da costa (Branco, 2003). Estes peixes têm pouca atividade e são demersais, preferindo fundos arenosos ou lodosos (Branco, 2003; Matusse, 2012; Villanueva et al., 2014). O linguado senegalês tem a característica de ser uma espécie eurialina tolerando salinidades desde os 5‰ até aos 55‰, embora o seu crescimento seja maior a salinidades entre os 25‰ e os 39‰.



Figura 2 - Mapa de distribuição do linguado senegalês (FishBase, 2015)

O linguado senegalês é muito semelhante ao linguado *Solea vulgaris*, que se distribui no Atlântico Norte, sendo também observado no Mediterrâneo. Estas duas espécies são muitas vezes confundidas, uma vez que têm uma distribuição parecida e uma morfologia semelhante. (Dinis et al., 1999; Imsland et al., 2003; Matusse, 2012).



## II - Estágio na Aquacultura Safiestela (Sustainable Aqua Farming Investments, Lda.)

## A empresa

A Safiestela é uma empresa de aquacultura em água salgada, situada no Lugar do Rio Alto, em Estela, Póvoa do Varzim (Figura 3). Esta unidade, juntamente com a Aquacria Piscícolas, S.A., localizada na Torreira, pertencem ao grupo Espanhol Sea8.



Figura 3 - Fachada da empresa Safiestela (Sea8, 2015)

Estas instalações iniciaram o seu funcionamento em 1993, com a engorda de pregado (*Psetta maxima*), sob a direção de uma antiga empresa a A. Coelho e Castro, Lda. Contudo, em Junho de 2009 o grupo espanhol Pescanova inaugurou a Acuinova, situada em Mira. Esta aquacultura tinha como objetivo ser a maior unidade do mundo na criação de pregado em aquacultura, tendo em vista uma produção de 7 mil toneladas por ano, tornando-se a maior produtora de pregado em Portugal (Pescanova). Face a esta elevada concorrência a antiga empresa abandonou a produção de pregado, passando a produzir linguado senegalês (*Solea senegalensis*). Mais tarde esta empresa foi comprada pela companhia espanhola Sea8 e é inaugurada a Safiestela.

Após ter sido adquirida, a unidade da Safiestela sofreu grandes modificações, para que fosse convertida numa maternidade de linguado senegalês, juntando a produção com a outra unidade desta companhia, a Aquacria, onde é realizada a engorda do linguado. Deste modo a produção de *Solea senegalensis* inicia-se na Safiestela, na Estela, onde manipulam os reprodutores e se obtêm os ovos. Há, ainda a manutenção das larvas até à fase da pré-engorda. Após esta fase de produção, os indivíduos são transportados para a Aquacria, na Torreira, onde fazem a engorda dos indivíduos para a posterior venda.

Esta empresa aposta num negócio sustentável, e como tal escolheu o sistema RAS procedendo ao tratamento e reutilização da água. Com a finalidade de salientar o uso deste sistema de produção, criaram uma designação para o sistema de criação de peixes – Aquacultura 3.0. Esta designação de aquacultura 3.0 relaciona-se com a aplicação de tecnologia e métodos inovadores que proporcionam estabilidade ambiental, bem-estar animal, sustentabilidade e previsibilidade, conforme descrito no site da empresa (Sea8, 2015).

Estas unidades do grupo Sea8 investem em projetos de I&D, que visam melhorar os conhecimentos sobre a produção intensiva do linguado, uma vez que a maioria da investigação é realizada em laboratórios. Estas investigações trazem benefícios para a otimização da produção de linguado (Gomes, 2012). Desta forma, esta unidade poderá tornar-se numa das maiores aquaculturas de linguado senegalês da Península Ibérica.

## Estágio

O estágio foi realizado entre 11 de Setembro de 2014 até dia 21 de Maio de 2015. Este estágio compreendeu duas fases, o estágio propriamente dito, onde foram realizadas as atividades da piscicultura, e ensaios experimentais, onde se testaram diferentes rações numa situação de desmame normal e em diferentes etapas de co-alimentação. Uma vez que a parte experimental foi realizada no desmame, o estágio centrou-se mais nesta área. Assim, foram realizadas as técnicas de manutenção e tratamento dos indivíduos da sala de desmame e da sala de cultivo larvar. Procedeu-se, ainda, ao tratamento e manutenção dos reprodutores e manutenção de ovos e análise dos três sistemas de água, nomeadamente desmame 1, desmame 2 e pré-engorda. O trabalho de estágio também passou pela aprendizagem do cultivo e manutenção de artémia e rotíferos.

## Estrutura da Safiestela

A empresa Safiestela está dividida em três grandes partes. Uma das partes destina-se ao tratamento de água, no qual se controla todos os sistemas de água da produção. A parte do desmame é outra área, englobando a sala dos reprodutores, a sala de incubação, a sala de cultivo larvar, a sala de desmame e as salas de alimento

vivo (rotíferos e artémia). Todas as salas pertencentes ao desmame têm as medidas de segurança necessárias, nomeadamente pedilúvios e material próprio, para que não haja qualquer tipo de contaminação. A parte do desmame é, ainda, provida da sala de ração e de um laboratório. A outra grande área da Safiestela pertence à pré-engorda.

Cada uma destas três áreas têm equipamentos próprios, incluindo galochas e oleados, para evitar a transmissão de contaminações.

## Reprodutores

Os reprodutores utilizados na piscicultura são capturados no meio natural, uma vez que produzem ovos viáveis e em maior quantidade, ao contrário dos reprodutores F1, ou seja, reprodutores descendentes de peixes em aquacultura (Imsland et al., 2003; Norambuena et al., 2013; Villanueva et al., 2014). Isto revela o principal problema na produção de linguados, pois não se consegue fechar o ciclo de produção, devido à perda de interesse que os machos revelam para com as fêmeas na época reprodutiva. Isto faz com que seja necessária a captura de peixes selvagens e posteriormente a sua aclimatização às condições da piscicultura, nomeadamente à alimentação inerte (Norambuena et al., 2013; Morais et al., 2014; Villanueva et al., 2014). Esta dependência da captura de exemplares selvagens é a maior ameaça da aquacultura de linguado senegalês, visto não ser possível a domesticação desta espécie.

Os reprodutores são capturados no meio selvagem e mantidos em quarentena num espaço separado do da produção (Morais et al., 2014). Os animais são inspecionados, com o objetivo de verificar se existem feridas que necessitem de tratamento. Para um melhor despiste de doenças é ainda recolhida uma amostra de sangue para posterior análise. A todos os reprodutores é colocado um chip para identificação do sexo dos animais. Nesta fase, inicia-se a habituação ao alimento inerte e ao contacto com as pessoas.

Finda esta fase, os reprodutores são transferidos para a sala dos reprodutores que é composta por quatro divisões diferentes, cada qual com 3 a 4 tanques. Cada sala corresponde a uma estação do ano, permitindo que a produção de ovos seja mantida durante todo o ano. Assim, a piscicultura pode contar com ovos viáveis todos os meses, conseguindo, assim, uma produção contínua de ovos. As diferentes estações do ano, que dão o nome às quatro salas dos reprodutores, identificam a época na qual os peixes irão dar ovos (Figura 4).



Figura 4 - Diferentes salas dos reprodutores (Sea8, 2015)

As desovas são induzidas pelo aumento gradual da temperatura da sala, até atingir 20-21°C. Com o aumento da temperatura verifica-se uma maior atividade dos reprodutores e um aumento da ingestão de alimento. As salas que não têm como objetivo a desova são mantidas a temperaturas inferiores a 16 °C, o que induz uma regressão das gónadas das fêmeas (Cañavate, 2005) e, conseqüentemente, à paragem da emissão dos ovos, à diminuição da quantidade de alimento inerte ingerido e menor movimentação dos peixes (Imsland et al., 2003; Villanueva et al., 2014). Aquando da emissão dos ovos, a salinidade da água deve ser mantida entre os 30 e os 35‰, uma vez que os ovos não conseguem flutuar a salinidades abaixo dos 30‰ (Dinis et al., 1999). O fotoperíodo da sala dos reprodutores é de 12L:12D, uma vez que os reprodutores apresentam maior atividade durante o dia e verificando-se perturbações na maturação das gónadas quando os indivíduos são colocados a fotoperíodos constantes (Cañavate, 2005; Morais et al., 2014). A fecundação ocorre, na maioria dos casos, durante a noite, daí que a recolha de todos os ovos seja feita de manhã (Villanueva et al., 2014).

Cada tanque possui uma relação de machos/fêmeas de 1:1, o que permite assegurar que se dá a fecundação. Esta relação de 1:1 é importante visto que a quantidade de esperma é inferior aos ovócitos expelidos pelas fêmeas, aumentando assim a probabilidade de todos os ovócitos serem fecundados (Cañavate, 2005; Villanueva, 2014).

Junto a cada tanque está inserido um coletor de ovos. Estes têm como objetivo armazenar os ovos que foram expelidos no tanque. Os coletores são colocados na saída da água dos tanques e possuem um filtro com malha de 500 µm, suficiente para não deixar passar os ovos, mas para que haja uma contante saída de água. É, ainda,

colocada uma pedra difusora a partir do fundo do coletor, o que proporciona a flutuação constante dos ovos.

O alimento a fornecer aos reprodutores é preparado nas instalações da piscicultura, de 2 em 2 dias, ou quando necessário. Para tal, é utilizada uma preparação de farinha, óleo de peixe e água, fornecendo as melhores condições nutricionais aos reprodutores, permitindo a melhor performance destes. O alimento é fornecido à mão, uma vez por dia, até à saciedade aparente, não havendo uma quantidade específica de alimento a fornecer. Esta quantidade será maior sempre que a temperatura aumente, já que esta induz um aumento do apetite. Em todos os casos, os reprodutores são alimentados à saciedade, sem que existam grandes desperdícios de ração. Caso se verifique que os indivíduos não estão a maturar da melhor forma, é fornecido mexilhão (*Mytilus edulis*) ou poliquetas (*Hediste diversicolor*), o que, juntamente com a ração que é fornecida, ajuda na maturação das gónadas (Dinis et al., 1999).

As atividades diárias desta zona da piscicultura centram-se na limpeza dos coletores e dos seus filtros; limpeza dos tanques dos reprodutores; preparação do alimento e sua distribuição pelos tanques; limpeza do material utilizado, assim como o chão e pedilúvio; medição da temperatura e do oxigénio de cada tanque; verificação dos permutadores de calor, tanto de aquecimento como arrefecimento, e o *backwash* dos filtros de areia. Durante a época de desova, verifica-se se os coletores contêm ovos, os quais são retirados para posterior incubação.

## Sala de Incubação

Após a recolha dos ovos dos coletores acoplados aos tanques dos reprodutores, é verificada a viabilidade destes. Para tal, os ovos em que se verifica flutuabilidade são colocados a incubar, enquanto os depositados são descartados, uma vez que a flutuabilidade dos ovos é uma das formas de se verificar se os ovos se encontram fecundados ou não.

A sala de incubação (Figura 5) é composta por tanques cilíndrico-cónicos com capacidade de 200 l. São utilizados este tipo de tanques pois favorecem a suspensão dos ovos quando introduzida uma pedra difusora no fundo do tanque, o que permite que não haja nenhuma “zona morta” no tanque, no qual os ovos se possam depositar. Cada tanque possuiu um filtro individual colocado na saída de água, com uma malha de 400

µm. Isto permite que haja uma constante renovação de água, sem que os ovos sejam perdidos (Villanueva et al., 2014). Esta sala é mantida em circuito de água aberto.



Figura 5 - Sala de incubação

Os ovos são incubados a uma densidade nunca superior a 500-1000 ovos/l, sendo que a temperatura da água permanece semelhante à dos tanques dos reprodutores, cerca dos 19 °C, e a salinidade entre os 30 e os 35‰, permitindo a fluabilidade dos ovos. No que respeita ao fotoperíodo, os ovos permanecem em total escuridão durante todo o tempo em que se encontram na sala de incubação (Dinis et al., 1999; Villanueva et al., 2014). Para evitar choques térmicos, quando os ovos são transferidos dos tanques de reprodutores para os de incubação, estes são previamente aclimatados à água dos tanques de incubação.

Algum tempo após a incubação, tanto o arejamento como a entrada de água são fechados por 10 minutos, permitindo que os ovos que não foram fecundados, ou que não se tenham conseguido desenvolver, afundem. Depois, realiza-se uma purga da água do fundo do tanque, de modo a eliminar os ovos não viáveis, abrindo a válvula situada no fundo do tanque, permanecendo dentro dos tanques os ovos viáveis (Villanueva et al., 2014).

Aquando da eclosão dos ovos, são retiradas amostras de larvas num volume conhecido, para que se possa estimar a quantidade de larvas que se encontram no tanque. A incubação dura aproximadamente 5 dias. Por definição considera-se que os dias -2 e -1 correspondem aos dias antes da eclosão, o dia 0, ao dia da eclosão e o dia

1 e 2 após a eclosão. É aos 2 DAH (dias após eclosão) que as larvas são transferidas para a sala de cultivo larvar e se inicia a introdução da alimentação.

Esta sala só é utilizada quando se está na época de desova. Nesta altura, diariamente são colocados ovos nos tanques, é verificada a quantidade de larvas eclodidas, são desinfetados os tanques que ficam vazios após a passagem das larvas para a sala de cultivo larvar, é verificado o caudal de água e o arejamento dos tanques, e desinfetado todo o material e sala após qualquer tipo de manuseamento. É, ainda, verificado o circuito de água, realizado do “backwash” e a verificação dos raios ultravioleta que realizam a desinfecção da água.

## Sala de Cultivo Larvar

A sala de cultivo larvar é composta por tanques cilíndrico-cónicos de 2700 l com um esgoto colocado centralmente, com malha que permita a passagem da água, mas impeça a passagem do alimento e das larvas. O caudal deverá fornecer 1 a 2 renovações de água por hora. O sistema de água é aberto, uma vez que as larvas, nesta fase do ciclo de vida, são muito frágeis. Como tal, são muito sensíveis a qualquer alteração que possa existir na qualidade da água (Villanueva et al., 2014).

As larvas são transferidas da sala de incubação para a sala de cultivo larvar, sendo colocadas nos tanques a uma densidade de 100 larvas/l (Dinis et al., 1999; Imsland et al., 2003). Nesta altura, as larvas têm aproximadamente 2,4 mm de comprimento e possuem uma vida pelágica, como tal necessitam de uma coluna de água grande para que se possam movimentar e procurar presas (Matusse, 2012; Villanueva et al., 2014). A temperatura deverá estar entre os 18 e os 20 °C e a salinidade nos 35 ‰ (Imsland et al., 2003; Villanueva et al., 2014). O fotoperíodo é mantido a 12h de luz:12h de escuridão (Imsland et al., 2003).

É necessário fornecer uma alimentação nutricionalmente adaptada à fase larvar, pois é disso que depende o sucesso do cultivo larvar. Uma má nutrição das larvas poderá levar a deformações esqueléticas, pigmentações anormais, maior incidência de doenças e mesmo à morte (Boglino et al., 2012). O tamanho do alimento também deve ser adequado ao tamanho da larva a alimentar; quanto maior for a larva, maior deverá ser o alimento ingerido por esta (Imsland et al., 2003). Assim, a alimentação das larvas é inicialmente composta por rotíferos (*Brachionus plicatilis*), até aos 5/6 DAH; aos 4 DAH inicia-se a introdução de artémia, primeiro a artémia AF (Inve®) e mais tarde artémia



de maiores dimensões EG (Inve®) (Cañavate, 2005; Imsland et al., 2003). A quantidade de alimento vivo administrado às larvas varia com a idade que estas têm, sendo essa quantidade estipulada pela empresa. Desta forma, ao longo do dia são realizadas várias contagens da quantidade de alimento vivo que existe nos tanques larvares. Assim, o volume de alimento vivo a fornecer será calculado tendo em conta a quantidade de alimento já existente no tanque perfazendo a quantidade total desejada e estipulada pela empresa.

O crescimento larvar é bastante rápido, uma vez que as larvas atingem 8 mm de comprimento aos 15 DAH (Dinis et al., 1999). A metamorfose inicia-se aos 11 DAH (Imsland et al., 2003), estando relacionada com a mudança de vida pelágica para a bentónica o que implica mudanças significativas na fisiologia do peixe (Blanco-Vives et al., 2010). Entre estas mudanças, salienta-se a migração do olho para o lado direito, a torção dos órgãos internos (Imsland et al., 2003) e ainda o desaparecimento da simetria bilateral (Matusse, 2012). Nesta altura, são transferidos para a “Zona de Desmame”, nomeadamente o Desmame 1, visto serem peixes bentónicos e não necessitarem de uma grande coluna de água, o que inclusivamente dificulta a captura das presas. As larvas são coletadas dos tanques cilíndrico-cónicos da Sala de Cultivo Larvar por sifonagem, para dentro de tanques pequenos e transferidas para o tanque de destino na Sala de Desmame.

As atividades realizadas nesta sala abrangem a monitorização do caudal, do arejamento e da qualidade da água de cada um dos tanques, através da medição da temperatura e do oxigénio dissolvido. Todos os dias, é retirada uma amostra de larvas de cada tanque e verifica-se se estas possuem conteúdo estomacal e procede-se à medição do seu tamanho, com a finalidade de verificar se existe crescimento diário, utilizando uma lupa. São realizadas amostragens ao alimento existente no tanque, de forma a quantificar a quantidade de alimento vivo existente em cada tanque e ajusta-lo à quantidade estipulada pela empresa. Estas amostragens também são realizadas com a utilização de uma lupa. Após a passagem das larvas para o desmame, é efetuada a desinfecção do chão, dos tanques e dos filtros. Procede-se, ainda, à verificação do sistema de água, nomeadamente à desinfecção por ultravioleta, aos filtros de areia e de cartucho e ao biofiltro.

## Sala de Desmame

A sala de Desmame (Figura 6) é composta por dois circuitos, o desmame 1 e o desmame 2. Estes circuitos servem para delimitar áreas, sendo que os peixes mais pequenos e mais frágeis se encontram no desmame 1 e os maiores, que já se alimentam com ração, permanecem no desmame 2 até terem 1 grama. É para o primeiro circuito que são transferidas as larvas após a metamorfose ficando lá até o início da ingestão de alimento inerte, ou seja, ração. No que diz respeito à água, o desmame 1 está em circuito aberto, enquanto o 2 está em circuito fechado.



Figura 6 - Sala de desmame (Sea8, 2015)

O desmame é composto por tanques quadrangulares com uma coluna de água de cerca de 20 cm. Os filtros estão inseridos no meio do tanque, sendo que esta zona é um pouco inclinada para facilitar a limpeza. Os filtros centrais variam com o tamanho do peixe, ou seja, peixes de maiores dimensões alimentam-se de ração com uma granulometria superior, sendo favorável um filtro com uma malha maior, que deixe passar mais a sujidade. O caudal de cada tanque é ajustado à densidade de peixes por forma a garantir uma boa renovação de água.

No que respeita ao fotoperíodo, a sala de desmame encontra-se na obscuridade. A luz só é acesa aquando da limpeza dos tanques, ou então quando se efetua algum tipo de manuseamento dos peixes, como é o caso das triagens.

Diariamente é realizada a limpeza de todos os tanques e das suas entradas e saídas de água, com o auxílio de uma escova. A saída de água é aberta para ajudar a

eliminar a sujidade dos tanques, o que faz baixar a coluna de água, permitindo um aumento da taxa de renovação. É, ainda, controlada a temperatura, o oxigénio e a salinidade dos tanques, pelo menos quatro vezes por dia, sendo que a primeira deverá estar entre os 19 e os 21 °C, o oxigénio nunca inferior a 8 mg/l e a salinidade entre os 30 e os 35‰. É muito importante verificar estes valores, uma vez que podem variar muito facilmente.

A alimentação difere entre o desmame 1 e o 2. No desmame 1, estão situadas as larvas após a metamorfose e que ainda se alimentam de artémia enriquecida. Assim, estas larvas são alimentadas manualmente de duas em duas horas, com as quantidades de artémia estipuladas nos protocolos da empresa. Quando estas larvas atingem os 31 DAH inicia-se o desmame. Após meio dia em jejum, aos 32 DAH, inicie-se a alimentação inerte (Dinis et al., 1999). Esta alimentação é feita através de alimentadores automáticos durante 24 horas (Morais et al., 2014), visto que uma maior frequência de alimentação reduz a heterogeneidade de crescimento (Imsland et al., 2003). Por volta desta altura, os juvenis (já não se denominam larvas, uma vez que já se alimentam com ração) passam para o desmame 2. A quantidade de ração fornecida a cada tanque é estipulada pela empresa e varia diariamente, tendo em conta a idade dos indivíduos. O tamanho da ração também aumenta com o aumento do tamanho do peixe. Semanalmente é avaliado o peso médio das larvas de cada tanque para determinação do crescimento e ajuste da quantidade de alimento a fornecer, em função da biomassa de cada um dos tanques.

No desmame são realizadas diversas triagens, com o objetivo de homogeneizar as populações dos tanques, uma vez que os peixes mais pequenos parecem ter um maior crescimento se forem triados e colocados a densidades mais baixas (Imsland et al., 2003). Estas triagens são feitas em dias estipulados pela empresa, ou quando se verifica uma grande dispersão de tamanhos. Além disso, quando são efetuadas, as triagens abrangem todos os peixes do mesmo lote. Para a realização deste procedimento são utilizadas cestas (Figura 7) com uma malha que permita os peixes mais pequenos saírem de dentro da cesta, permanecendo os maiores e que se querem manter. Para tal, as triagens são realizadas num tanque sem peixes, sendo que, no final de todas as triagens, o tanque fique somente com os peixes que saíram pela malha da cesta. É nesta altura que se consegue analisar de melhor forma o peixe, aproveitando, assim, para se eliminar os peixes que demonstrem deformações ou algum sinal de patologia, sendo descartados juntamente com os peixes mais pequenos e que não conseguiram crescer de uma forma uniforme. Para evitar o *stress* dos peixes aquando da triagem, são pescados do tanque original poucos peixes de cada vez e transportados

em caixas pequenas com água desse mesmo tanque, e então colocados na cesta de triagem, que se encontra dentro de água. Após todos os peixes pequenos saírem da cesta, os peixes maiores são rapidamente colocados dentro de um novo tanque, que foi previamente desinfetado. Este procedimento é realizado diversas vezes até que o tanque de origem se encontre vazio.



Figura 7 – Exemplo de cesta de triagem (Sea8, 2015)

Após todos os manuseamentos dos tanques, os materiais utilizados são desinfetados separadamente, ou seja, tanto o desmame 1 como o 2 têm o seu próprio material. No final do dia é ainda efetuada a limpeza e desinfecção do chão e pedilúvios, que são esvaziados, limpos e cheios novamente. Além disso, é ainda verificado todo o sistema de recirculação de água e realizado o *backwash* dos filtros de areia, que consiste na passagem da água através do filtro no sentido contrário ao fluxo de filtragem com o objetivo de remover partículas orgânicas e inorgânicas retidas.

## Sala de Rotíferos

A sala dos rotíferos (Figura 8) é composta por tanques cilíndrico-cónicos onde se procede à cultura de rotíferos (*Brachionus plicatilis*). A água deverá estar a um pH entre 7,5 e 8,5 e a temperatura a 25 °C, o que permite uma maior quantidade de oxigénio dissolvido levando a uma menor quantidade de bactérias na cultura (Støttrup et al., 2003; Ferreira, 2009). A iluminação dos rotíferos é natural, sendo a sala iluminada através de janelas.



Figura 8 - Sala de rotíferos (Sea8, 2015)

Para o cultivo dos rotíferos é utilizada água do mar filtrada e desinfetada, com uma salinidade entre 30 e 35 ‰, sendo cultivados a uma densidade de 10000 rotíferos/ml (Støttrup et al., 2003; Ferreira, 2009). A produção é realizada de forma contínua e a sua qualidade nutricional é mantida através da alimentação com produtos comerciais. Para a continuidade da produção, são realizadas diversas filtrações, com o intuito de separar os indivíduos maiores dos mais pequenos, e diminuindo a densidade do tanque para que se possa manter a cultura (Støttrup et al., 2003).

Os rotíferos (Figura 9 e 10) apresentam pequenas dimensões, daí serem fornecidos como primeiro alimento às larvas (Ferreira, 2009). Para que possuam todos os nutrientes necessários às larvas, são enriquecidos antes do seu fornecimento.



Figura 9 - Fêmeas de *B. plicatilis* com ovos (Ferreira, 2009)



Figura 10 - Macho e fêmea de *B. plicatilis* (Ferreira, 2009)

Diariamente são realizadas filtrações para homogeneizar o tamanho da população do tanque, uma vez que se trata de uma produção em contínuo. Cada tanque é amostrado, para contagem da quantidade de rotíferos produzidos. É, ainda, efetuada a limpeza, desinfecção do material e dos tanques que foram utilizados. A alimentação e o enriquecimento (caso a produção necessite de rotíferos para alimentar as larvas) são preparados a partir de produtos comerciais, e são fornecidos várias vezes ao dia, no horário estipulado. A temperatura e o oxigénio dissolvido são mantidos constantes. A temperatura é mantida através de uma sonda com termostato que mantém a temperatura constante; o oxigénio é controlado pelas medições durante o dia, e mantido constante com o aumento ou diminuição do fluxo de oxigénio que se encontra no tanque, através de uma pedra difusora.

### Sala da Artémia

A produção de artémia (Figura 11) inicia-se com a incubação de cistos em tanques cilíndrico-cónicos de capacidade de 200 l. Este tipo de tanques são os mais apropriados, na medida em que ao colocar o arejamento no fundo dos tanques proporcionará uma aerificação homogénea, ao contrário com o que acontece em tanque cilíndricos ou quadrados, que mesmo com o arejamento vão proporcionar partes onde existirá uma redução do oxigénio e deposição dos cistos (Lavens et al., 1996).



Figura 11 - Sala de Cultivo de Artémia (Sea8, 2015)

A quantidade de cistos incubados varia com a quantidade de artémia necessária para a alimentação das larvas. Os cistos são, então, adicionados à água do tanque de maneira a que não formem aglomerados, uma vez que poderá provocar a uma menor taxa de eclosão. O arejamento é colocado no fundo do tanque permitindo, assim, a suspensão dos cistos no tanque e, é ainda, adicionado oxigénio a uma concentração de 5 mg/l (Ferreira, 2009), sendo que a taxa ótima de oxigénio varia com o tamanho do tanque e a densidade de cistos que foram incubados (Lavens et al., 1996). Os níveis de oxigénio são medidos regularmente (Støttrup et al., 2003). A temperatura da água é mantida a 28 °C (Lavens et al., 1996; Ferreira, 2009), com recurso a resistências e termostatos individuais colocados em cada tanque (Lavens et al., 1996). O pH da água é de 8 (Lavens et al., 1996; Støttrup et al., 2003; Ferreira, 2009) de modo a assegurar o funcionamento ótimo das enzimas de eclosão (Lavens et al., 1996). Uma vez que os metabolitos da eclosão diminuem significativamente o pH, este mantém-se constante com a introdução de hidróxido de sódio, isto é, soda cáustica (Ferreira, 2009). Cada tanque é iluminado individualmente de modo a garantir uma intensidade luminosa alta (Lavens et al., 1996; Ferreira, 2009). A salinidade da água mantém-se entre os 30 e os 35 ‰, uma vez que o uso de água do mar é a forma mais prática de cultivo (Støttrup et al., 2003).

Passadas 24 horas de incubação é realizada a primeira filtração, de forma a separar os cistos da artémia eclodida, seguida de uma segunda filtração para completar a remoção de impurezas (Lavens et al., 1996; Ferreira, 2009). Nesta altura, as luzes presentes em cima dos tanques são desligadas, uma vez que a artémia apresenta fototropismo positivo. Assim, como o tanque é aberto pela parte de baixo, se a luz permanecesse ligada, seria mais complicado retirar a artémia, que se ia concentrar na parte superior do tanque. São, posteriormente realizadas contagens para determinar o número de artémia total do tanque que eclodiu.

As larvas mais pequenas alimentam-se de náuplios de artémia mais pequenos, nomeadamente, artémia AF (Inve ®) (Figura 12), daí ser produzida durante um período de tempo reduzido. Após a filtração, estas são colocadas num recipiente com arejamento e a baixas temperaturas. Para que isso seja possível, e uma vez que se trata de um pequeno volume de artémia, colocam-se blocos de gelo na água, permitindo parar o crescimento destes indivíduos. Com a paragem de crescimento a artémia AF (Inve ®) permanece no estado de náuplio mantendo um elevado valor energético e nutritivo (Lavens et al., 1996; Ferreira, 2009).



Quando possível, as larvas são alimentadas com artémia de maiores dimensões, ou seja, Artémia EG (Inve ®) (Figura 13). Contudo, estes meta-náuplios – nome dado a artémias de maiores dimensões (instar III) – já não possuem níveis energéticos e nutritivos suficientes para alimentar as larvas, todavia têm custos bastante baixos, comparativamente à artémia AF (Inve ®). Este tipo de artémia de maiores dimensões é utilizada após a bioencapsulação, o que permite melhorar o seu valor nutritivo, garantido um alimento equilibrado às larvas (Lavens et al., 1996; Ferreira, 2009; Boglino et al., 2012;). A utilização deste tipo de artémia quando as larvas são maiores é benéfico, na medida em que necessitam de se alimentar com menos presas para obter a quantidade nutricional necessária, não necessitando de despender grandes quantidades de energia na sua captura (Ferreira, 2009). Quando se produz artémia EG (Inve ®), após a filtração é verificada a sua concentração, e as artémias são colocados novamente dentro de tanques procedendo-se à bioencapsulação, utilizando emulsões comerciais.



Figura 12 - Artémia AF (Inve ®)  
(Ferreira, 2009)



Figura 13 - Artémia EG (Inve ®)  
(Ferreira, 2009)

Após a bioencapsulação, a artémia é novamente filtrada e lavada com água salgada para retirar todos os metabolitos existentes na água e o excesso de produto de bioencapsulação que possa existir. De seguida, são feitas novamente contagens da concentração de artémia, antes de esta ser colocada dentro de um tanque que será mantido num termoacumulador, a temperaturas baixas, de modo a preservar a qualidade nutricional da artémia até ao momento em que é fornecida, podendo ser administrada às larvas durante todo o dia (Ferreira, 2009).

As tarefas diárias realizadas na sala de cultivo de artémia passam pela desinfecção dos tanques e material, verificação da temperatura, ajuste do pH e pela adição de soda cáustica. São feitas, ainda, contagens da quantidade de artémia em cada tanque, uma vez que é bastante importante manter a quantidade de Artémia necessária para alimentar as larvas da produção. É preparada a alimentação da artémia conforme a quantidade de indivíduos que existem nos tanques, e esta alimentação, que contém os produtos de bioencapsulação, é administrada várias vezes ao dia.



## Sala da Pré-engorda

A sala da pré-engorda (Figura 14) é composta por “raceways” de 12 m, com uma coluna de água de 15 a 20 cm (Villanueva et al., 2014) encontrando-se em circuito fechado de circulação de água. Os peixes permanecem na pré-engorda até aproximadamente aos 40 gramas, sendo, de seguida, transportados para a Aquacria onde vão permanecer até ao tamanho de venda.



Figura 14 - Sala da pré-engorda (Sea8, 2015)

A alimentação é fornecida através de alimentadores automáticos. A quantidade de ração fornecida é estipulada pela empresa de acordo com o tamanho e biomassa de cada tanque. Periodicamente, o peso médio de cada tanque e a densidade são verificados, o que permitirá o ajuste da quantidade de ração a fornecer. A granulometria da ração é, também, ajustada ao tamanho dos juvenis.

Na pré-engorda verifica-se uma elevada dispersão de tamanhos, como tal, são realizadas diversas triagens, permitindo homogeneizar o tamanho dos juvenis de cada tanque. Estas triagens permitem, também, a verificação da existência de deformações, incluindo despigmentação e despiste de doenças. A triagem é efetuada numa máquina que calibração que separa o peixe de acordo com o seu tamanho (Villanueva et al., 2014).

Diariamente, procede-se à limpeza dos tanques, com o recurso a uma escova. É realizada, ainda, a limpeza da entrada e da saída de água. O material utilizado é seguidamente desinfetado, o que previne contaminações entre tanques. É verificadas,

diversas vezes por dia a temperatura e o oxigénio dissolvido da água. O chão é desinfetado no final do dia e é feita a desinfecção dos tanques quando se realiza a triagem dos peixes. Procede-se, também, à renovação dos pedilúvios nas entradas desta sala. No que respeita ao circuito de água é verificado todo o sistema e realizado o *backwash* do filtro de areia.

## Análises da qualidade da água da Empresa

O controlo da qualidade da água dos dois sistemas do desmame (desmame 1 e 2) e da pré-engorda é realizado diariamente. Para tal, é efetuada a análise da amónia, dos nitritos, do bromo, da transmitância a  $\lambda 400$  e a  $\lambda 500$  (com o auxílio de um espectrofotómetro) da temperatura, do pH, da salinidade e do potencial de oxidação-redução (redox).

A concentração de amónia e de nitritos pode variar dependendo da quantidade de ração fornecida e da eficiência dos filtros biológicos. Para a monitorização da amónia, são utilizados os reagentes salicilato de amónia e o cianureto de amónia; na monitorização dos nitritos utiliza-se o reagente Nitriver 3, sendo este um método que determina baixas quantidades de nitritos, denominado de método diazótico (HACH, 2015). A análise da transmitância permite determinar a quantidade de sólidos em suspensão e assim verificar a eficiência dos filtros mecânicos do sistema de filtração.

A empresa é composta por inúmeros postos de controlo dos parâmetros da recirculação e desinfecção da água, onde se pode verificar o redox de todos os sistemas. Se o valor se encontra abaixo ou acima do estipulado, é necessário verificar o sistema de ozono, uma vez que este influencia este parâmetro.

A salinidade é medida através de um refratómetro e a temperatura com um termómetro. O pH é medido através de uma sonda.

## Sistema de Recirculação em Aquacultura

Tradicionalmente, as aquaculturas intensivas convencionais utilizavam água que era libertada para os cursos de água com pouco ou nenhum tratamento, e embora os efluentes parecessem limpos, graças ao efeito da diluição, esta representava uma potencial ameaça de poluição ambiental (Mirzoyan et al., 2010). Considerações

ambientais e a consciencialização da população em geral para este problema tem impulsionado o desenvolvimento de práticas de produção aquícola mais sustentáveis (Martins et al., 2010; Rijn, 2013). Como tal, foi necessário desenvolver um sistema sustentável para a aquacultura (Zhang et al., 2011; Badiola et al., 2012), diminuindo o impacto ecológico da produção de resíduos (Zhang et al., 2011; Rijn, 2013). O sistema de recirculação em aquacultura (RAS) surgiu para colmatar os efeitos negativos da aquacultura, nomeadamente, deterioração e destruição dos ecossistemas aquáticos, propagação de doenças pelos efluentes da piscicultura (Zhang et al., 2011; Rijn, 2013), diminuição da biodiversidade local pela fuga de indivíduos não nativos das instalações (Martins et al., 2010; Zhang et al., 2011; Rijn, 2013) e, como já referido, a poluição dos cursos de água onde os efluentes são libertados (Rijn, 2013).

O RAS é um sistema de recirculação fechado e compreende diversas vantagens, como a baixa necessidade de água (Ebeling et al., 1995; Martins et al., 2009; Mirzoyan et al., 2010; Zhang et al., 2011; Badiola et al., 2012), uma vez que esta só é substituída por perdas na limpeza e evaporação (Rijn, 2013), o que é importante em locais onde o acesso a este recurso é limitado (Mirzoyan et al., 2010; Zhang et al., 2011); a necessidade de menor área de produção, uma vez que este sistema permite grandes densidades de peixes; e o controlo da temperatura (Ebeling et al., 1995; Martins et al., 2010) e da qualidade da água (Ebeling et al., 1995; Zhang et al., 2011). Este sistema permite que 90 a 99% da água seja reutilizada (Zhang et al., 2011; Badiola et al., 2012; Rijn, 2013), após um tratamento mecânico e biológico (Zhang et al., 2011; Rijn, 2013), o que permite a otimização da produção dos peixes em condições de cultivo independentes do meio ambiente (Badiola et al., 2012; Rijn, 2013). Por tais motivos e devido à sua imagem de sustentabilidade (Badiola et al., 2012), a Safiestela utiliza o RAS nas suas instalações (Figura 15).



Figura 15 – Zona de tratamento da água (Sea8, 2015)

Um aspeto importante relativamente a estes sistemas, além das mencionadas, refere-se ao total controlo do seu ambiente interno e controlo das infeções, o que se traduz num aumento da eficiência de utilização do alimento (diminuição taxa de conversão alimentar) (Martins et al., 2010; Zhang et al., 2011; Rijn, 2013), e no aumento da saúde e bem-estar (Martins et al., 2010; Zhang et al., 2011). A diminuição da taxa de conversão alimentar é determinada pelo controlo e monitorização da alimentação fornecida, ajustando-a para que não se verifique sobrealimentação (Rijn, 2013), e pela manutenção da qualidade ótima da água, uma vez que o comportamento alimentar dos peixes pode ser influenciado por diversos fatores da água, como a temperatura, amónia, nitritos e oxigénio dissolvido na água (Ebeling et al., 1995; Zhang et al., 2011).

O sistema de recirculação em aquacultura teve início nos anos 80, e, atualmente, são produzidas diversas espécies neste sistema, maioritariamente espécies marinhas como o linguado, o pregado e o rodovalho (Martins et al., 2010). Devido à elevada complexidade, é composto por diversos sistemas para que a água possa ser novamente utilizada, como a remoção de sólidos, a oxidação da amónia e de outros produtos da excreção dos peixes e a desinfecção contra vírus e bactérias. No RAS o tratamento primário passa pela remoção da amónia e de resíduos sólidos, constituindo as tarefas mais difíceis neste sistema (Badiola et al., 2012; Rijn, 2013).

## Remoção de Resíduos Sólidos

Os sólidos presentes nos sistemas RAS são compostos, na sua maioria, por excreção dos peixes (fezes) e alimento não ingerido (Ebeling et al., 1995; Mirzoyan et al., 2010; Rijn, 2013), e devem ser retirados do sistema o mais rapidamente possível (Ebeling et al., 1995). Existem quatro categorias diferentes de sólidos que podem ser encontrados no sistema: os sólidos sedimentáveis, os sólidos em suspensão, os sólidos dissolvidos e os sólidos flutuantes (sólidos finos em suspensão) (Ebeling et al., 1995), existindo diferentes métodos para a remoção destas diversas partículas, que apresentam vários tamanhos (Mirzoyan et al., 2010).

Os sólidos sedimentáveis são os mais fáceis de remover do sistema. Estes sólidos, tal como o nome indica, sedimentam facilmente, o que permite que sejam retirados dos tanques mediante a limpeza dos mesmos (Ebeling et al., 1995). Os sólidos em suspensão não são tão facilmente removidos (Ebeling et al., 1995; Mirzoyan et al., 2010) podendo contribuir, juntamente com a matéria orgânica, para o escurecimento da água e o aumento do consumo de oxigénio, devido à decomposição bacteriana

(Mirzoyan et al., 2010). É, por isso, necessário proceder à filtração mecânica da água, com o uso de um filtro de tela e/ou filtro granular, como é o caso do filtro de areia (Ebeling et al., 1995; Mirzoyan et al., 2010). Os sólidos dissolvidos e finos em suspensão podem não ser retirados pelas técnicas acima referidas (Martins et al., 2010), como tal utiliza-se o fracionamento por espuma, ou seja, um “*protein skimming*” para a sua remoção. Aqui, a água, após a filtração mecânica, é introduzida numa coluna de água fechada onde bolhas de água são libertadas no fundo, criando bolhas na parte superior da coluna de água. Ao submergirem, as bolhas de ar captam as partículas em suspensão, levando à criação de uma espuma, que é retirada da água, diminuindo a quantidade de sólidos dissolvidos (Ebeling et al., 1995; Martins et al., 2010; Mirzoyan et al., 2010).

Os sólidos em suspensão, inclusive os finos, são a maior preocupação, devido ao impacto que poderão provocar em todo o sistema RAS (Badiola et al., 2012). Além disso, podem-se depositar nas brânquias nos peixes, favorecendo a presença e desenvolvimento de patogénicos (Ebeling et al., 1995; Zhang et al., 2011). Paralelamente, quando não existe uma adequada e eficiente remoção destas partículas, o biofiltro (Figura 16) pode ser afetado, existindo uma menor quantidade e viabilidade das bactérias nitrificantes (Badiola et al., 2012). Além destes problemas, os sólidos em suspensão podem, ainda, colocar em perigo os equipamentos, o que levaria a um aumento de capital (Badiola et al., 2012). Por tais motivos, os filtros deverão ser limpos para evitar a acumulação destes resíduos. Os filtros de areia são limpos através do “*backwash*” (Mirzoyan et al., 2010), onde a água é colocada a circular pelo sentido contrário, removendo as partículas acumuladas, e os de tela, são limpos com água.



Figura 16 – Biofiltro (Sea8, 2015)

Os sólidos removidos, são descarregados no sistema local de esgoto, ou para unidades de tratamento, como as lagoas de estabilização (Mirzoyan et al., 2010; Rijn, 2013).

## Remoção de Azoto

Após a remoção dos resíduos sólidos, procede-se à remoção dos compostos solúveis que se encontram na água. O azoto é maioritariamente formado por amónia, o principal produto de excreção resultante do catabolismo das proteínas e também da pela decomposição das proteínas presentes nas fezes e restos de alimentos, por ação microbiana (Ebeling et al., 1995). A amónia é extremamente tóxica para os peixes (Ebeling et al., 1995; Zhang et al., 2011), pelo que deve ser removida a uma taxa igual à que é produzida, o que manterá a sua concentração próxima de zero (Ebeling et al., 1995). Para a remoção da amónia é utilizada a filtração biológica, ou biofiltração, pela ação das bactérias nitrificantes (Ebeling et al., 1995; Pedersen et al., 2012). Estas bactérias utilizam a amónia como fonte de energia, oxidando-a e produzindo nitritos, como subproduto. Os nitritos também são nefastos para os peixes pois inibem a hemoglobina dos peixes de absorver o oxigénio dissolvido da água (Ebeling et al., 1995), e é posteriormente eliminado pela ação de bactérias anaeróbias que produzem azoto gasoso que é libertado pelo arejamento dos biofiltros (Ebeling et al., 1995; Rijn, 2013). Este processo envolve consumo de oxigénio pelas bactérias e a libertação de dióxido de carbono, o que leva ao aumento do pH da água (Ebeling et al., 1995). No sentido de otimizar a remoção dos compostos azotados pelo biofiltro é necessário que a remoção de sólidos seja eficaz, uma vez que estes podem comprometer os processos oxidativos das bactérias, além de provocar competição entre bactérias heterotróficas e autotróficas (Badiola et al., 2012; Martins et al., 2010).

Existem vários fatores que influenciam a capacidade de remoção de azoto pelo biofiltro. O principal fator é a modificação dos parâmetros da água induzidos, por exemplo, pelas limpezas dos tanques e pelas triagens. Outro fator é a alteração da biomassa dos taques, pelo aumento da idade, remoção de peixes do sistema ou ainda, pela junção de peixes após as triagens. Tudo isto se reflete na quantidade de compostos azotados excretados para a água, daí ser necessário que o biofiltro seja projetado tendo em conta estas alterações (Badiola et al., 2012).

## Controlo dos parâmetros da água

O oxigénio ( $O_2$ ) dissolvido é um fator abiótico que deve ser tido em conta num sistema de recirculação. Este é responsável pela sobrevivência dos peixes e, quando a níveis adequados, pode aumentar o consumo de ração, logo a eficiência alimentar, o que leva a um maior crescimento dos indivíduos (Zhang et al., 2011). Os níveis de oxigénio dissolvido na água podem influenciar o metabolismo do peixe, a densidade a que os peixes estão colocados e a atividade do biofiltro (Ebeling et al., 1995). É de salientar que o  $O_2$  do sistema é consumido pelos peixes, bem como pelas bactérias que constituem o biofiltro, daí ser necessário manter este parâmetro dentro dos níveis ótimos. O arejamento do biofiltro, bem como da água dos tanques aumenta a quantidade de oxigénio, contudo para o controlo do  $O_2$  este deve ser medido várias vezes ao dia, e se necessário deve ser injetando oxigénio puro dentro do sistema (Ebeling et al., 1995).

O dióxido de carbono ( $CO_2$ ) é produzido pelos peixes e a sua concentração aumenta, com o aumento da densidade dos tanques (Badiola et al., 2012). Todavia, como produto da nitrificação do biofiltro, também é libertado  $CO_2$  (Ebeling et al., 1995). Um aumento deste composto leva a uma diminuição do pH tornando a água mais ácida (Ebeling et al., 1995), reduzindo o bem-estar dos peixes e afetando toda a produção (Badiola et al., 2012). Para o controlo deste parâmetro utiliza-se um indicador universal que verifica o pH da água. A diminuição dos níveis de  $CO_2$  é efetuada pelo arejamento da água, e se necessário, esse arejamento deve ser reforçado (Ebeling et al., 1995).

A temperatura é deveras importante para os peixes, uma vez que influencia o seu crescimento, o seu metabolismo, bem como o seu movimento, já que se trata de animais ectotérmicos (Zhang et al., 2011). Além disso, a temperatura afeta a quantidade de oxigénio dissolvido na água, condicionando o funcionamento do biofiltro. A temperatura deve ser medida várias vezes durante o dia, para verificar se não existem grandes flutuações, uma vez que o biofiltro pode ser afetado se existirem grandes mudanças de temperatura. Como o biofiltro é estabilizado a uma certa temperatura, oscilações podem inibir o crescimento das bactérias, levando a que demorem algum tempo a estabilizarem-se novamente (Ebeling et al., 1995).

## Desinfecção da água

Após a remoção dos resíduos da água, é realizado um tratamento adicional que passa pela desinfecção da mesma. São utilizados diferentes métodos, como a ozonização e a radiação ultravioleta (Rijn, 2013).

O ozono ( $O_3$ ) é usado para combater agentes patogénicos que possam afetar os peixes, e ajuda na oxidação da matéria orgânica, da amónia e dos sólidos em suspensão. O ozono promove, ainda, uma melhoria no funcionamento dos filtros de tela e do fracionamento por espuma, bem como minimiza a quantidade de sólidos dissolvidos, tornando a água mais clara (Martins et al., 2010). Devido às suas diversas qualidades, o ozono, pode ser considerado para melhorar a qualidade da água, e não apenas para a sua desinfecção (Attramadal et al., 2012). Todavia é necessário manter a quantidade de ozono controlada, pois, uma eleva concentração deste composto, pode levar à morte dos peixes, uma vez que é muito tóxico, devido à posterior formação de brometos (Martins et al., 2010). O aumento dos sólidos em suspensão provoca uma menor eficiência do ozono (Attramadal et al., 2012; Badiola et al., 2012), induzindo o uso de maiores quantidades de ozono, e portanto, de brometos, aumentando a toxicidade para os peixes (Badiola et al., 2012; Martins et al., 2010). Por conseguinte, o  $O_3$  presente nos tanques é controlado pela medição da oxidação-redução (Attramadal et al., 2012).

Devido à elevada toxicidade que o ozono pode provocar aos peixes, é muitas vezes combinado com a radiação UV para desinfetar a água, diminuindo o recurso ao ozono (Martins et al., 2010). Os ultravioletas são usados para controlar a proliferação de bactérias. A sua ação pode ser influenciada pela quantidade de sólidos em suspensão no sistema o que pode proteger os microrganismos que se pretende eliminar (Attramadal et al., 2012), daí a necessidade de uma boa remoção dos sólidos.



### III – Ensaio 1: Avaliação de diferentes dietas de desmame para larvas de linguado senegalês (*Solea senegalensis*)

## Introdução

Um dos fatores limitantes ao desenvolvimento da aquacultura é a dependência no uso de óleos e farinhas de peixe no fabrico de dietas para a alimentação dos peixes (Almaida-Pagán et al., 2007; Torstensen et al., 2008; Benitez-Dorta et al., 2013; Borges et al., 2014). A aquacultura utiliza aproximadamente 90% do óleo de peixe produzido globalmente, verificando-se um aumento constante da sua procura que poderá ultrapassar a sua própria produção (Borges et al., 2014). Com a estagnação dos recursos pesqueiros e o aumento constante da produção em aquacultura (Torstensen et al., 2008; Reis et al., 2014), é de primordial importância encontrar alternativas sustentáveis e economicamente viáveis aos óleos e farinhas de peixe, para formulação de dietas (Almaida-Pagán et al., 2007; Torstensen et al., 2008; Fernandes et al., 2012; Cabral et al., 2013; Dorta et al., 2013; Borges et al., 2014).

Atualmente, os óleos de peixes são incorporados nas dietas para peixes como principal fonte de energia e de ácidos gordos essenciais (Borges et al., 2014). O óleo de peixe é composto por elevadas quantidades de ácidos gordos altamente insaturados de cadeia longa n-3 (LC-HUFA), principalmente ácido docosahexaenóico (22:6 n-3 – DHA), ácido eicosapentanoico (20:5 n-3 – EPA) e ácido araquidónico (20:4 n-6 – ARA) (Almaida-Pagán et al., 2007; Fernandes et al., 2012; Borges et al., 2014; Reis et al., 2014). No caso dos peixes marinhos, o óleo de peixe é uma fonte essencial para o fornecimento dos LC-HUFA. Os peixes de água salgada são incapazes, ou têm uma menor capacidade do que os de água doce, de alongar e dessaturar os ácidos gordos C18-HUFA em EPA e DHA, já que têm limitada capacidade de expressar as dessaturases  $\Delta 6 / \Delta 5$  (Castro et al., 2014). Portanto, a capacidade para produzir EPA, DHA ou ARA, a partir de precursores C18-HUFA é praticamente ausente (NRC, 2011), sendo essencial o seu fornecimento na dieta.

Do ponto de vista da saúde humana, estes ácidos gordos desempenham, também, um papel muito importante, prevenindo distúrbios neurológicos, doenças cardiovasculares e inflamatórias e ajudando no controlo da diabetes tipo 2 (Fernandes et al., 2012; Borges et al., 2014; Reis et al., 2014). Além disso, tanto o DHA como o EPA têm funções importantes na fluidez da membrana citoplasmática (Borges et al., 2014).

Uma alternativa sustentável ao uso de óleo de peixe é o óleo vegetal (Almaida-Pagán et al., 2007; Torstensen et al., 2008; Benitez-Dorta et al., 2013; Moreira et al., 2014; Reis et al., 2014), pois existe em grande quantidade, e como não provém de um recurso finito, como a pesca, tem um preço mais baixo (Moreira et al., 2014; Reis et al.,

2014). Os óleos vegetais são geralmente ricos em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) (Torstensen et al., 2008; Borges et al., 2014) e contêm grandes quantidades de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia n-6 e n-9 (Benitez-Dorta et al., 2013), como o ácido linoleico (18:2 n-6 – LOA) (Torstensen et al., 2008; Borges et al., 2014). Por outro lado, não possuem na sua constituição EPA nem DHA, pelo que não atende aos requisitos de ácidos gordos essenciais dos peixes marinhos, sendo, portanto, imprescindível a incorporação de óleo de peixe na dieta de modo a garantir o fornecimento das quantidades ideais de ácidos gordos essenciais para os peixes marinhos. Esta é, sem dúvida, considerada a principal barreira na substituição de óleo de peixe por óleo vegetal (Reis et al., 2014).

Os óleos vegetais são provenientes de diversas fontes e o perfil de ácidos gordos varia entre elas (Almaida-Pagán et al., 2007; Benitez-Dorta et al., 2013; Borges et al., 2014; Reis et al., 2014). O óleo de soja é muito rico em ácido linoleico (LOA), o óleo de colza em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e o óleo de linhaça tem uma grande quantidade de ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3 – ALA) (Torstensen et al., 2008; Reis et al., 2014).

A incorporação de óleos vegetais em dietas para peixes pode ser realizada utilizando uma só fonte vegetal ou a mistura de vários óleos, de modo a modelar o perfil de ácidos gordos da dieta (Torstensen et al., 2008; Benitez-Dorta et al., 2013; Reis et al., 2014). Desta forma, a mistura de óleos vegetais permite colmatar as deficiências individuais de cada óleo, mimetizando parcialmente o perfil de ácidos gordos do óleo de peixe, tornando a dieta mais equilibrada (Borges et al., 2014; Reis et al., 2014). No entanto, mesmo com a mistura de diversos óleos vegetais, os ácidos gordos essenciais para os peixes marinho, como DHA e EPA, não estão presentes (Torstensen et al., 2008). Atualmente, face aos elevados níveis de incorporação do óleo de peixe nas dietas de peixes marinhos, a redução do seu nível de incorporação parece ser possível (Torstensen et al., 2008; Benitez-Dorta et al., 2013; Borges et al., 2014; Reis et al., 2014). Contudo, esta tem de ser criteriosamente avaliada de modo a não comprometer a saúde e bem-estar nos peixes, já que a incorporação de elevadas taxas de óleos vegetais pode reduzir a resistência a patogénicos e alterar diversos parâmetros do sistema imunitário (Benitez-Dorta et al., 2013). Paralelamente, a substituição do óleo de peixe por vegetais pode levar à alteração do perfil lipídico do peixe, diminuindo a concentração em PC-HUPA e assim diminuir os efeitos benéficos do consumo de peixe, para os seres humanos (Benitez-Dorta et al., 2013; Cabral et al., 2013).

Vários estudos sobre o salmão do Atlântico demonstraram que não existe redução do crescimento, mas sim uma melhoria, quando o óleo de peixe foi completamente substituído por óleos vegetais, sendo a farinha de peixe a única fonte de ácidos gordos de cadeia longa n-3 (Torstensen et al., 2008). No entanto, quando foram realizados estudos na dourada e no robalo, um maior crescimento só foi conseguido quando a substituição de óleo de peixe foi baixa (Reis et al., 2014). Num outro ensaio realizado pelos mesmos autores, em juvenis de linguado senegalês, não se verificou diferenças a nível de crescimento e eficiência alimentar quando o óleo de peixe foi completamente substituído por óleo de linhaça, tendo o mesmo sido observado quando a substituição foi feita pela mistura de óleo de linhaça, soja e colza (Reis et al., 2014). Verificou-se, ainda, que o nível de DHA do músculo dos juvenis alimentados com dietas sem inclusão de óleo de peixe eram semelhantes ao observado em juvenis alimentados com dietas formuladas com óleo de peixe.

No entanto, para outras espécies de aquacultura, têm-se verificado que a substituição do óleo de peixes por óleos vegetais modula a composição em ácidos gordos do músculo (Turchini et al., 2009). Para colmatar estas diferenças, alguns autores têm defendido ser possível alimentar os peixes de aquacultura com dietas com níveis muito limitados de óleo de peixe e pouco antes de a sua comercialização introduzir uma dieta de finalização, rica em óleo de peixe. Estas dietas de acabamento ou finalização permitiriam que o perfil de ácidos gordos da carcaça recuperasse, aproximando-se do perfil dos peixes selvagens, garantindo um elevado teor em ácidos gordos polinsaturados ao consumidor final (Reis et al., 2014).

No âmbito do estágio realizado na Safiestela foi efetuado um ensaio experimental denominado SOLEW 152, com o objetivo de avaliar o efeito da substituição do óleo de origem marinha por óleos de origem vegetal em dietas de desmame para larvas de linguado senegalês. O efeito destas dietas foi avaliado relativamente à taxa sobrevivência e performance de crescimento.

## Materiais e Métodos

O ensaio foi desenvolvido em duas partes. Na primeira parte foram testadas cinco dietas distintas e com diferentes níveis de incorporação de óleos marinhos e vegetais, em larvas com idade compreendida entre 32 DAH e 70 DAH. Estas dietas foram introduzidas como dieta de desmame em larvas de linguado. Na segunda parte foi testada a utilização da melhor dieta aferida na primeira parte do ensaio versus a dieta atualmente em uso na empresa, em larvas com idade compreendida entre os 70 e os 90 DAH. Em ambas as partes, foi avaliado o crescimento, a sobrevivência, a taxa de conversão alimentar e a taxa de crescimento relativa das larvas.

### 1ª Parte

O primeiro ensaio experimental teve a duração de 41 dias e decorreu entre 30 de Janeiro e 9 de Março de 2015. Antes do início do ensaio propriamente dito, as larvas foram aclimatas ao sistema experimental durante dois dias. O sistema experimental era composto por 15 tanques, de 20 litros de capacidade e uma altura de coluna água de 20 cm, com um esgoto (Figura 17), localizado na zona de desmame. O sistema de água manteve-se em circuito aberto e a renovação de água foi de 1 renovação por hora até ao 4º dia de ensaio e, daí em diante, de 2 renovações por hora. Cada tanque era provido de um alimentador automático do tipo “tapete”, ajustado para fornecer alimento de forma semi-contínua durante 18 horas (Figura 18).

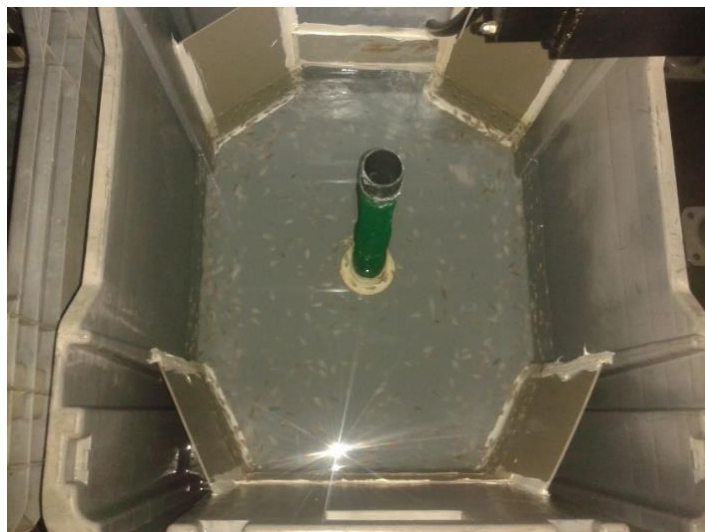


Figura 17 - Aspeto de um tanque utilizado no ensaio

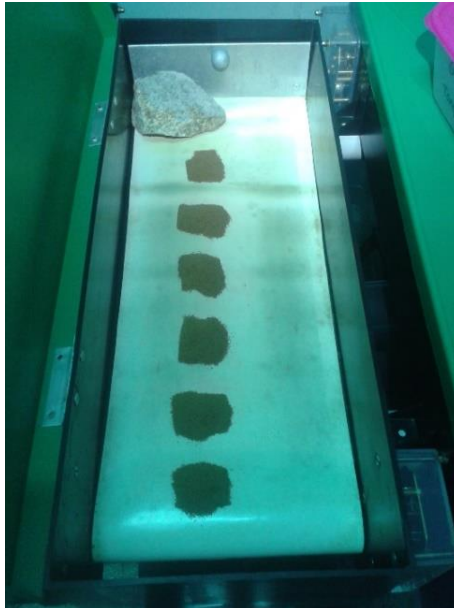


Figura 18 - Aspeto de um alimentador de tapete e forma de colocação da ração

Dois dias antes do início do ensaio foram constituídos 15 lotes de larvas, correspondendo a uma densidade de 1000 larvas por tanque. As larvas foram obtidas do mesmo lote inicial e a densidade foi estimada, pelo peso médio das larvas do tanque de origem, de modo a minimizar o *stress* provocado pela contagem das mesmas. No dia 28 de Janeiro (30 DAH), as larvas foram alimentadas com artémia, de acordo com o protocolo de alimentação larvar da empresa. No dia 29 (31 DAH), o alimento fornecido foi, também, artémia, contudo, a partir das 19h00, as larvas foram sujeitas a jejum, tal como se procede na empresa, antes de se iniciar o fornecimento da ração inerte. No dia 30 de Janeiro (32 DAH) iniciou-se o ensaio experimental, com a introdução das dietas.

Foram testados 5 tratamentos experimentais em triplicado, conforme descrito na Tabela 6. Um dos tratamentos representa o protocolo atualmente em uso a empresa, o tratamento Aglo + GD (Tanques 3, 8 e 15), tendo sido alimentado com a dieta Aglonorse até aos 45 DAH e a dieta Gemma Diamond durante o restante ensaio. Os restantes tratamentos experimentais são A, A2 e A3, diferindo entre si relativamente ao nível de incorporação de óleos marinhos, tendo, assim: dieta A muito rica; dieta A2 rica e dieta A3 moderadamente rica em óleos marinhos. O aumento da inclusão de óleo marinho fez-se à custa da inclusão de óleo vegetal, de modo a manter o mesmo nível de lípidos em todas as dietas. Antes da introdução da dieta experimental, os grupos foram alimentados inicialmente com uma dieta rica em proteína solúvel, servindo com atraente (dieta G). O protocolo alimentar para cada tratamento experimental é apresentado no Tabela 6.

Tabela 6 – Protocolo alimentar dos tratamentos experimentais\*

Tratamento	Tanques	Dieta/Tempo
<b>G + A</b>	1, 9, 11	Dieta G – Dos 32 até 38 DAH Dieta A – Dos 39 até 70 DAH
<b>G + A2</b>	4, 7, 14	Dieta G – Dos 32 até 38 DAH Dieta A2 – Dos 39 até 70 DAH
<b>G + A3</b>	6, 10, 13	Dieta G – Dos 32 até 38 DAH Dieta A3 – Dos 39 até 70 DAH
<b>G(V) + A2 (V)</b>	2, 5, 12	Dieta G – 32 e 33 DAH 50% G + 50% A2 – Dos 34 até 38 DAH 20% G + 80% A2 – Dos 39 até 45 DAH Dieta A2 – Dos 46 até 70 DAH
<b>Aglo + GD</b>	3, 8, 15	Aglonorse – Dos 32 até 45 DAH Gemma Diamond – Dos 46 até 70 DAH

\*32 DAH corresponde ao primeiro dia e 70DAH ao final do ensaio

A quantidade de alimento fornecido foi determinada pela tabela de alimentação da empresa embora, quando verificada grande agitação dos peixes à volta do tanque, foi introduzido alimento, para além do estipulado.

Este ensaio esteve integrado num projeto em que não foi fornecida a composição em ingredientes das dietas por sigilo da empresa que as formulou e produziu, a Sparos Lda. No entanto, a composição proximal das dietas foi avaliada e é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição proximal das dietas experimentais utilizadas no ensaio

Dieta	Matéria seca (DM,%)	Cinzas (%DM)	Proteína (%DM)	Gordura (%DM)	Energia (kJ/g DM)	Fósforo (%DM)
A	92,4	11,4	67,0	20,4	23,4	2,2
A2	91,8	12,3	66,5	22,2	23,7	2,3
A3	92,1	14,0	66,1	23,2	23,0	2,2
G	91,0	12,9	66,9	22,9	23,8	2,2

Durante a experiência foram realizadas 3 amostragens. A inicial realizou-se antes da primeira alimentação do ensaio, retirando-se 3 larvas por tanque, uma vez que

provinham do mesmo conjunto de tanques. As restantes amostragens foram realizadas aos 45 DAH e no final do ensaio, aos 70 DAH, retirando-se 30 larvas por tanque, que posteriormente foram medidas por fotografia no programa Axio Vision Rel. 4.8 e congeladas, individualmente, a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foram liofilizadas, para quantificação do peso seco. Devido a elevada mortalidade dos juvenis e ao aparecimento de uma infeção, os tanques 1 e 2 foram descartados, aos 42 e 43 DAH, respetivamente. Como tal, não foram incluídos nas amostragens.

Diariamente foram efetuadas limpezas dos tanques, bem como a verificação de alguma patologia ou mortalidade, sendo esses indivíduos, se existissem, eliminados. O alimento foi colocado nos alimentadores após todas as rotinas serem efetuadas e de forma a não cair nos tanques continuamente, o que poderia levar à acumulação de ração no fundo do tanque (Figura 17). A temperatura média, durante o ensaio, foi de  $19,5^{\circ}\text{C}$ , e o oxigénio dissolvido de  $9,5 \pm 1 \text{ mg/l}$ .

No final do ensaio foram contados os peixes restantes em cada tanque, com a finalidade de determinar o número de peixes no início do ensaio. Esta prática foi realizada de forma a não provocar *stress* nos indivíduos que, posteriormente, foram colados num tanque da produção para a utilização na 2ª parte deste ensaio.

## Cálculos

### Peso Húmido

$$\text{Peso Húmido} = \text{Peso Seco} / 0,2$$

(assumindo que as larvas são constituídas por 80% de água)

### Taxa de Crescimento Relativo

$$\text{RGR} = (e^g - 1) \times 100$$

(em que  $g = [\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}) \times \text{tempo}^{-1}]$ )

### Sobrevivência

$$\% \text{ sobrevivência} = 100 - (\text{Mortalidade} / \text{número de peixes inicial} \times 100)$$

### Taxa de conversão alimentar

$$\text{FCR} = \text{alimento ingerido (g)} / \text{aumento da biomassa (g)}$$



## Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados de forma a obter a média, desvio padrão e o coeficiente de variação de cada tanque e tratamento. Posteriormente, estes dados foram submetidos a uma análise de variância a um fator (ANOVA), com nível de significância de 5%. Em caso de diferenças significativas entre as médias foi aplicado um teste de comparação de médias (teste Tukey). Para as variáveis em que não se verificou a homogeneidade de variâncias, os valores foram transformados do seguinte modo:

### Transformação logarítmica (para valores inteiros)

$TL = \ln (\text{valor a transformar});$

$TL = 1 - \ln (\text{valor a transformar}),$  quando o valor é inferior a 0.

### Transformação de uma percentagem (para valores percentuais)

$TP = \text{ASEN} (\text{RAIZQ} (\text{valor a transformar} / 100))$

- ASEN = Arco do seno
- RAIZQ = Raíz quadrada

## 2ª Parte

A segunda parte do ensaio decorreu de 9 a 29 de Março de 2015 (duração de 20 dias) e consistiu num prolongamento do 1º ensaio, com o objetivo de testar apenas a melhor dieta determinada no 1º ensaio versus a dieta controlo (atualmente usada na empresa). Assim foram testadas a dieta A3 e a dieta controlo, em linguados com 70 DAH, uma vez que o 1º ensaio acabou exatamente aos 70 DAH. O ensaio contou, então, com dois tratamentos testados em triplicados, num total de 6 tanques.

No final do 1º ensaio, e após a contagem final dos peixes, estes foram triados com uma malha de 0,8 mm e, determinou-se o peso médio dos maiores. Foram então colocados 500 peixes por tanque, de forma a manter as densidades utilizadas na empresa. Esta densidade foi estimada pelo peso médio dos juvenis. Os 3 tanques de controlo (11, 12 e 15) foram alimentados com Gemma Diamond, e os restantes (10, 13 e 14) foram alimentados com a dieta A3. Neste ensaio a granulometria da ração era de 800 µm e aos 80 DAH, aumentou-se a granulometria da ração para 1000 µm.

Neste ensaio o protocolo experimental foi idêntico ao descrito para a 1ª parte. Os procedimentos realizados diariamente foram também iguais aos da primeira parte do ensaio. A temperatura média foi de 19,2 °C e o oxigénio dissolvido de 10,8±1 mg/l.

Foram retiradas 10 amostras de cada um dos tanques aos 71 DAH e aos 90 DAH. Essas amostras foram fotografadas para análise do comprimento com o programa Axio Vision Rel. 4.8, e foram congeladas a -18 °C para posterior liofilização para determinar o peso seco.

No final do ensaio, procedeu-se à contagem dos indivíduos. O número inicial de indivíduos foi então calculado com base neste dado e na mortalidade registada para cada tanque.

## Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados para obtenção da média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada tanque e tratamento. A análise estatística dos dados obtidos foi igual à indicada na 1ª parte deste ensaio.

## Resultados

### 1º Parte

Na Tabela 8 é apresentado o peso seco e o comprimento total dos peixes alimentados com as diferentes dietas experimentais, ao longo do ensaio. Os valores apresentados foram determinados como sendo a média, das médias dos 3 tanques que receberam o mesmo tratamento. Todavia, a análise estatística foi realizada considerando o peixe como unidade experimental e não o tanque.

Tabela 8 - Crescimento médio de cada tratamento aos 32, 45 e 70 DAH 1.\*

	Tratamentos				
Peso Seco (mg)	Aglo + G D	G + A	G + A2	G + A3	G(V) + A2(V)
32 DAH	9,3±2,9 <sup>a</sup>	9,3±2,9 <sup>a</sup>	9,3±2,9 <sup>a</sup>	9,3±2,9 <sup>a</sup>	9,3±2,9 <sup>a</sup>
45 DAH	20,5±14,7 <sup>a</sup>	16,6±10,5 <sup>a</sup>	19,8±18,7 <sup>a</sup>	20,6±7,1 <sup>a</sup>	20,5±7,2 <sup>a</sup>
70 DAH	86,9±42,6 <sup>a</sup>	117,4±59 <sup>b</sup>	126,6±65,8 <sup>b</sup>	157,3±66,5 <sup>c</sup>	124,4±66,2 <sup>b</sup>
Comprimento total (mm)					
32 DAH	16,4±2,4 <sup>a</sup>	16,4±2,4 <sup>a</sup>	16,4±2,4 <sup>a</sup>	16,3±2,4 <sup>a</sup>	16,4±2,4 <sup>a</sup>
45 DAH	20,7±2,7 <sup>ab</sup>	19,6±2,9 <sup>a</sup>	19,6±2,5 <sup>a</sup>	21,3±2,6 <sup>b</sup>	21,2±2,6 <sup>b</sup>
70 DAH	32,5±5,3 <sup>a</sup>	38,2±6,9 <sup>b</sup>	37,8±7,3 <sup>b</sup>	42,1±6,2 <sup>c</sup>	37,7±6,5 <sup>b</sup>

\*1Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p < 0.05$ ).

\*32 DAH corresponde ao primeiro dia e 70DAH ao final do ensaio

A evolução do peso seco (mg) individual dos linguados, ao longo do período experimental durante o ensaio está apresentado no Gráfico 5. Como a amostragem aos 32 DAH foi uma média de 3 peixes retirados de todos os tanques (45 indivíduos), o peso seco foi igual em todos os tratamentos, uma vez que provinham do mesmo lote inicial.

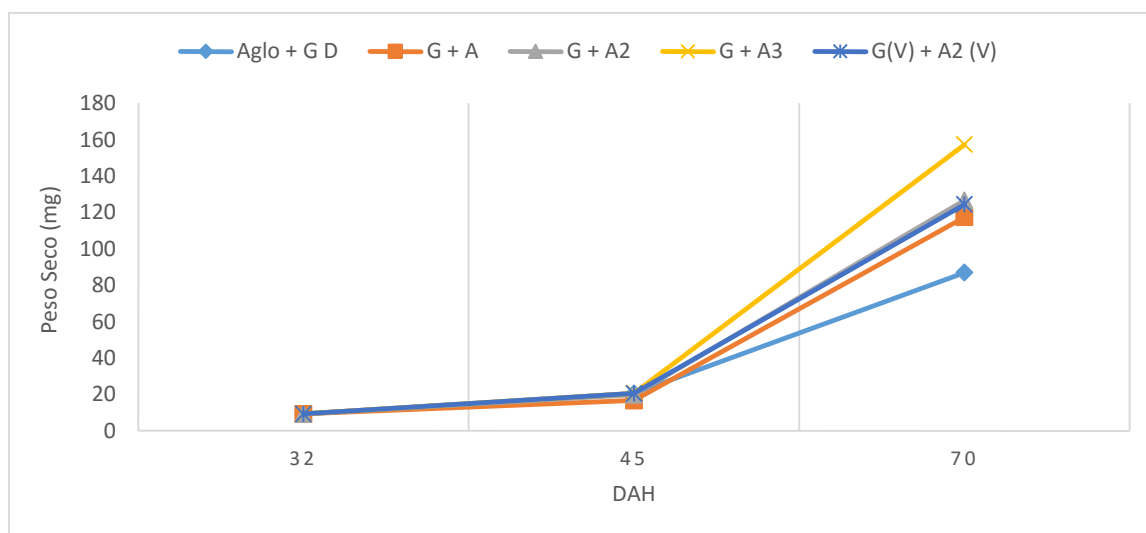


Gráfico 5 - Evolução do peso (mg peso seco) dos diferentes tratamentos

Aos 45 DAH não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos. Contudo, aos 70 DAH, foram verificadas diferenças significativas entre tratamentos, conforme indicados na Tabela 8 e no Gráfico 6.

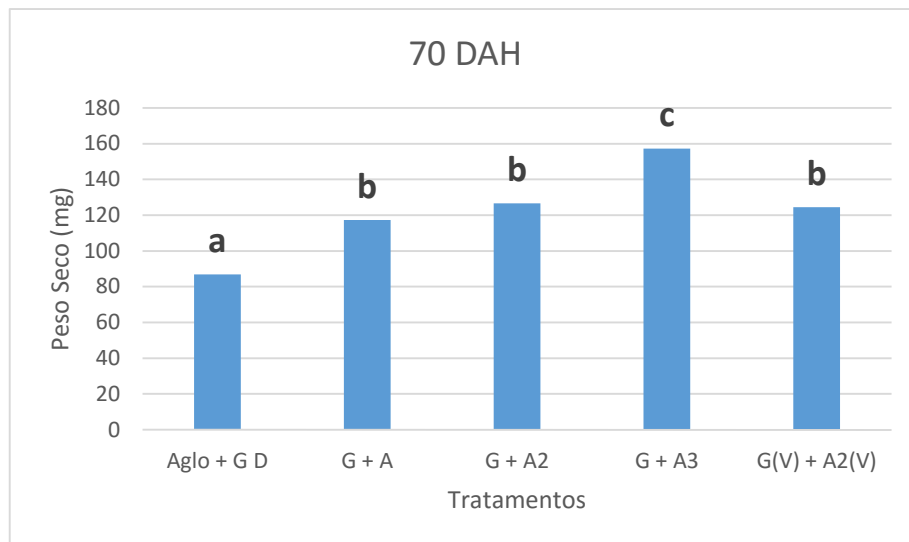


Gráfico 6 – Peso final dos linguados (mg peso seco) aos 70 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

No final do ensaio, o peso final dos peixes alimentados com a dieta Aglo+GD foi significativamente inferior aos peixes alimentados com as restantes dietas. O peso dos peixes alimentados com as dietas G+A, G+A2 e o G(V)+A2(V) foram estatisticamente iguais e significativamente inferiores ao da dieta G+A3 que registou o maior peso final (Tabela 8; Gráfico 6).

No que respeita ao comprimento individual dos linguados, tal como acontece com o peso seco, na primeira amostragem (32 DAH) como todos os peixes provinham do mesmo lote inicial, não foram registadas diferenças significativas. No Gráfico 7 é apresentada a evolução do comprimento individual dos linguados, ao longo do ensaio.

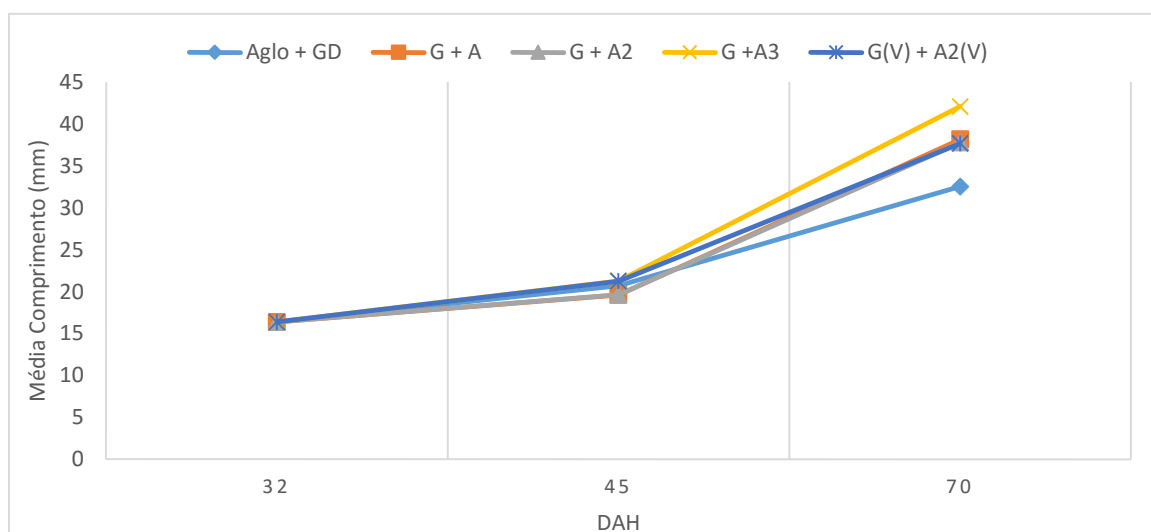


Gráfico 7 – Evolução do comprimento (mm) dos diferentes tratamentos

O comprimento médio final dos linguados, aos 45DAH e aos 70 DAH, diferiu significativamente com o tratamento (Gráficos 8 e 9).

Aos 45 DAH não se verificaram diferenças significativas no comprimento dos linguados alimentados com as dietas G+A e G+A2, o qual foi significativamente menor do que com as dietas G+A3 e G(V)+A2(V). Os linguados alimentados com a dieta controlo apresentaram um comprimento maior ao das dietas G+A e G+A2 e menor aos linguados alimentados com as dietas G+A3 e G(V)+A2(V), no entanto esta diferenças não foram significativas (Tabela 8; Gráfico 8).

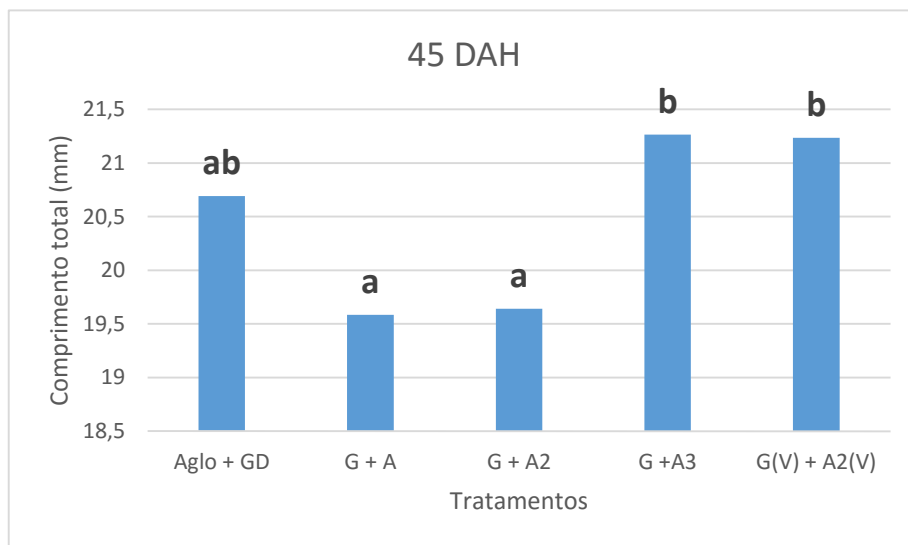


Gráfico 8 – Comprimento dos linguados (mm) aos 45 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

Aos 70 DAH não se verificaram diferenças significativas no comprimento dos linguados alimentados com os tratamentos G+A, G+A2 e G(V)+A2(V), o qual foi significativamente maior ao registado para a dieta controlo (Aglo+GD) e significativamente menor ao da dieta G+A3 (Tabela 8; Gráfico 9).

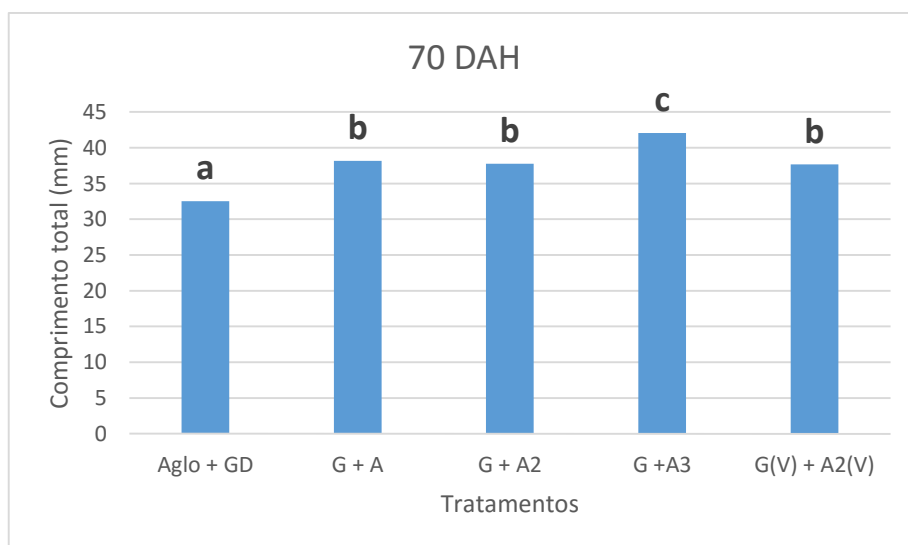


Gráfico 9 - Comprimento dos linguados (mm) aos 70 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

No início do ensaio, os lotes experimentais foram constituídos com base no peso das larvas e não houve quantificação do número de indivíduos usados, de modo a minimizar o *stress* que o manuseamento das larvas, para determinação do número, poderia causar. Assim, o número de larvas usado no início do ensaio foi determinado no final do ensaio. Para isso, no final do ensaio, o número de peixes por tanque foi determinado e a este juntou-se o número de peixes usados nas amostragens bem como o número total de mortos. O número inicial de peixes usado em cada tratamento foi o seguinte (Tabela 9):

Tabela 9 – Número inicial de peixes de cada tanque

Dieta	Tanques	Nº de linguados
<b>Aglo + GD</b>	3	1110
	8	1093
	15	1028
<b>G+A</b>	9	893
	11	755
<b>G+A2</b>	4	932
	7	802
	14	895
<b>G+A3</b>	6	1022
	10	725
	13	925
<b>G(V)+A2(V)</b>	5	971
	12	776

Com base no número de indivíduos no início e no final do ensaio foi determinada a sobrevivência, como exposto na Tabela 10 e no Gráfico 10.

Tabela 10 – Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos<sup>1</sup>.

Tratamentos				
Aglo + GD	G + A	G + A2	G + A3	G(V) + A2(V)
93,8±1,7 <sup>c</sup>	83,4±0,7 <sup>a</sup>	87,1±2,3 <sup>abc</sup>	86,7±3 <sup>ab</sup>	92,2±1,9 <sup>bc</sup>

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si (p<0.05).

No geral a taxa de sobrevivência foi muito alta, variando entre 83 e 94%, independentemente do tratamento (Tabela 10; Gráfico 10); tendo sido máxima para o grupo controlo e mínima para a dieta G+A. A taxa de sobrevivência dos linguados alimentados com os tratamentos G+A, G+A3 e G+A2 não apresentou diferenças significativas entre si. Os linguados alimentados com as dietas controlo e G(V)+A2(V) apresentam uma taxa de sobrevivência similar e maior do que a observada para os restantes tratamentos.

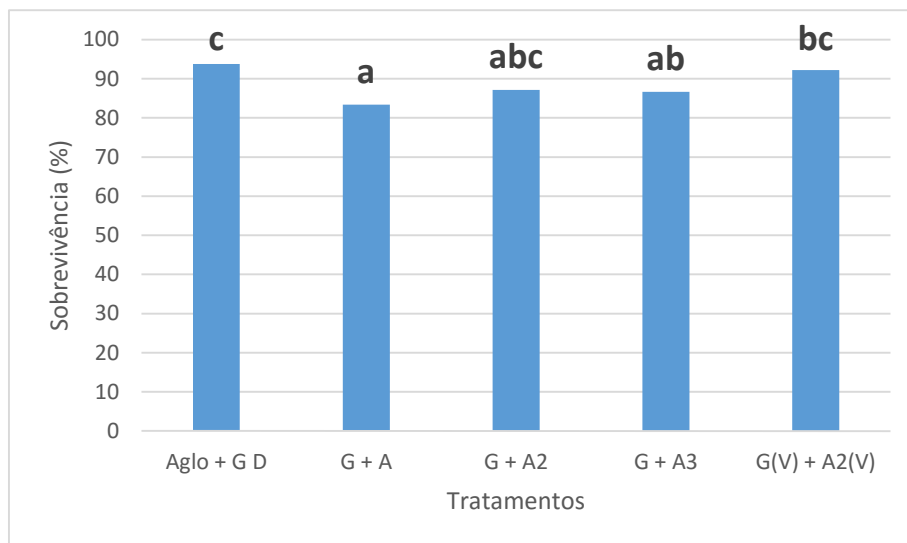


Gráfico 10 – Taxa de sobrevivência dos linguados para cada tratamento. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas  $p < 0.05$ .

Para a análise do fator de conversão alimentar (FCR) foi necessário proceder à transformação logarítmica dos valores, uma vez que não se verificou homogeneidade de variâncias (Gráfico 11). Embora existissem diferenças entre os diferentes tratamentos estas não foram significativamente relevantes. No entanto podemos verificar que a dieta controlo resultou numa menor eficiência de utilização do alimento do que todos os restantes tratamentos.

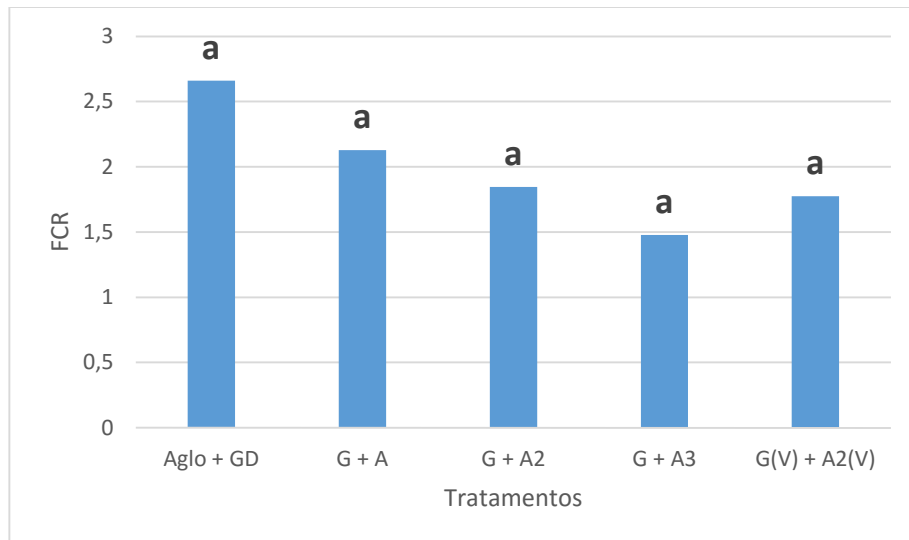


Gráfico 11 – Taxa de conversão alimentar (FCR) entre os diferentes tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

A taxa de crescimento relativa estimada para cada grupo experimental é apresentada na Tabela 11 e no Gráfico 12. Para a análise estatística foi necessária a transformação em percentagem dos valores, uma vez que não se verificou a homogeneidade de variâncias.

Tabela 11 – Média da taxa de crescimento relativa (RGR; % day<sup>-1</sup>) de cada tratamento. <sup>1</sup>

Tratamentos				
Aglo + GD	G + A	G + A2	G + A3	G(V) + A2(V)
6,±0,5 <sup>a</sup>	6,9±0,8 <sup>ab</sup>	7,1±0,3 <sup>ab</sup>	7,7±0,4 <sup>b</sup>	7,1±0,4 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p < 0.05$ ).

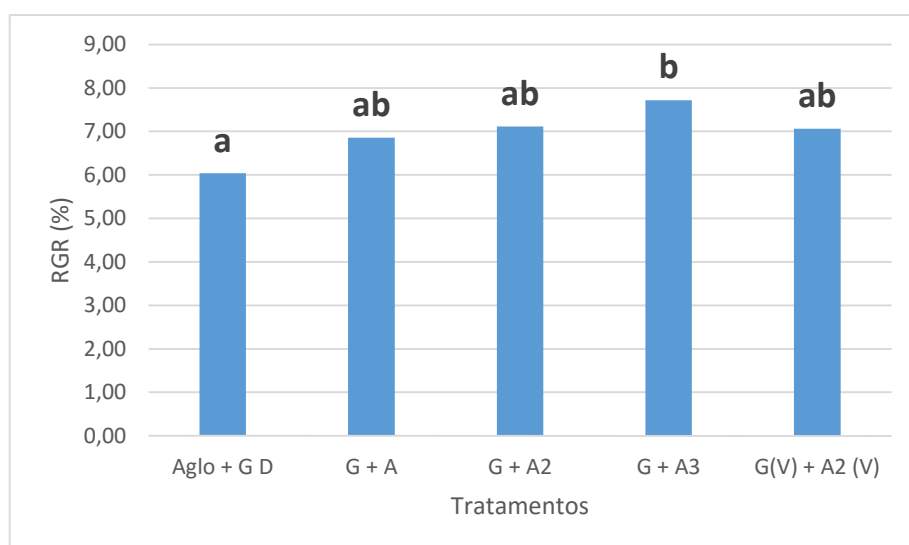


Gráfico 12 – Taxa de crescimento relativa (RGR; % day<sup>-1</sup>) entre os diferentes tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).



A RGR dos linguados variou entre 6.0 e 7.7, para os grupos alimentados com a dieta controlo e G+A3, respetivamente. A RGR dos linguados alimentados a dieta G+A3 foi significativamente mais elevado do que aqueles alimentados com as restantes dietas. A dieta controlo e a G+A3 foram significativamente diferentes, existindo um crescimento superior no tratamento G+A3, sem, contudo, apresentar diferenças significativas entre os restantes tratamentos.

## 2ª Parte

Na Tabela 12 é apresentado o crescimento médio dos linguados no início (71 DAH) e no final (90 DAH) da 2ª parte do ensaio. Apesar de tanto aos 71 DAH e aos 90 DAH o peso dos linguados alimentados com a dieta A3 ser maior do que com a dieta controlo não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos aos 71 DAH. O Gráfico 13 apresenta a evolução do peso médio dos dois tratamentos.

Tabela 12 – Crescimento médio de cada tratamento aos 71 e 90 DAH

Peso seco (mg)	Tratamentos	
	Aglo + GD	A3
71 DAH	151,5±47,5 <sup>a</sup>	164,3±48,5 <sup>a</sup>
90 DAH	263,6±84,7 <sup>a</sup>	336,8±119,8 <sup>b</sup>
<b>Comprimento total (mm)</b>		
71 DAH	42,2±4,9 <sup>a</sup>	42,3±4,4 <sup>a</sup>
90 DAH	49,6±6,2 <sup>a</sup>	54,5±6,1 <sup>b</sup>

\*71 DAH corresponde ao primeiro dia e 90 DAH ao final do ensaio

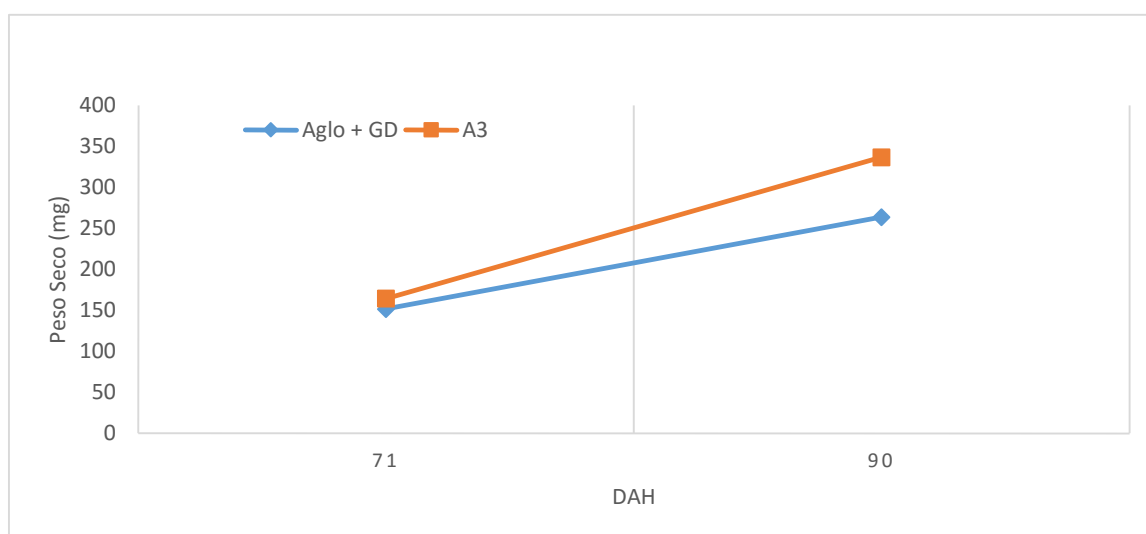


Gráfico 13 - Evolução do peso (mg peso seco) dos diferentes tratamentos

Embora não se verificassem diferenças aos 71 DAH, tal não acontece aos 90 DAH (Gráfico 14). Aos 90 DAH verificou-se que os linguados alimentados com a dieta A3 tiveram um peso seco significativamente maior que os alimentados com a dieta controlo.

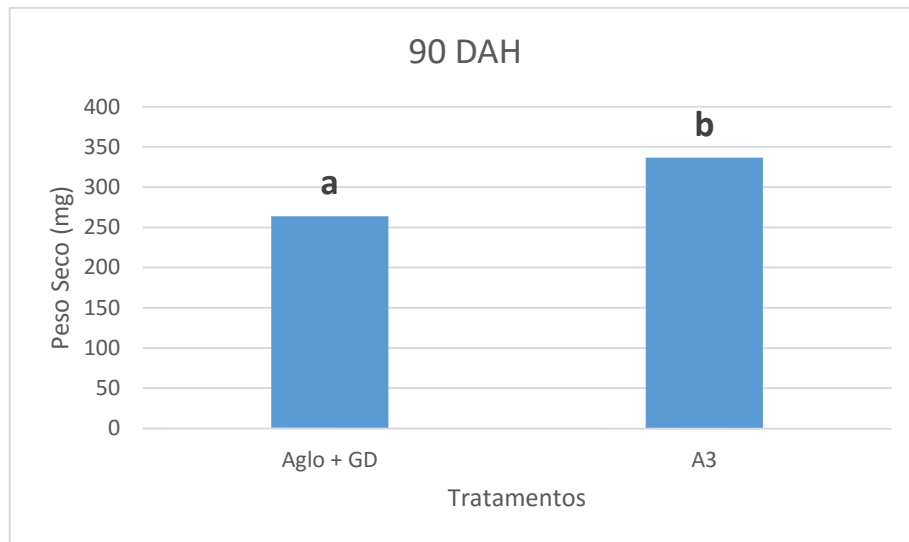


Gráfico 14 - Peso dos linguados (mg peso seco) aos 90 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

A evolução do comprimento médio ao longo do ensaio é apresentada no Gráfico 15. Não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos aos 71 DAH. No entanto, aos 90 DAH o comprimento dos linguados alimentados com a dieta A3 foi significativamente mais elevado do que com a dieta controlo (Gráfico 16).

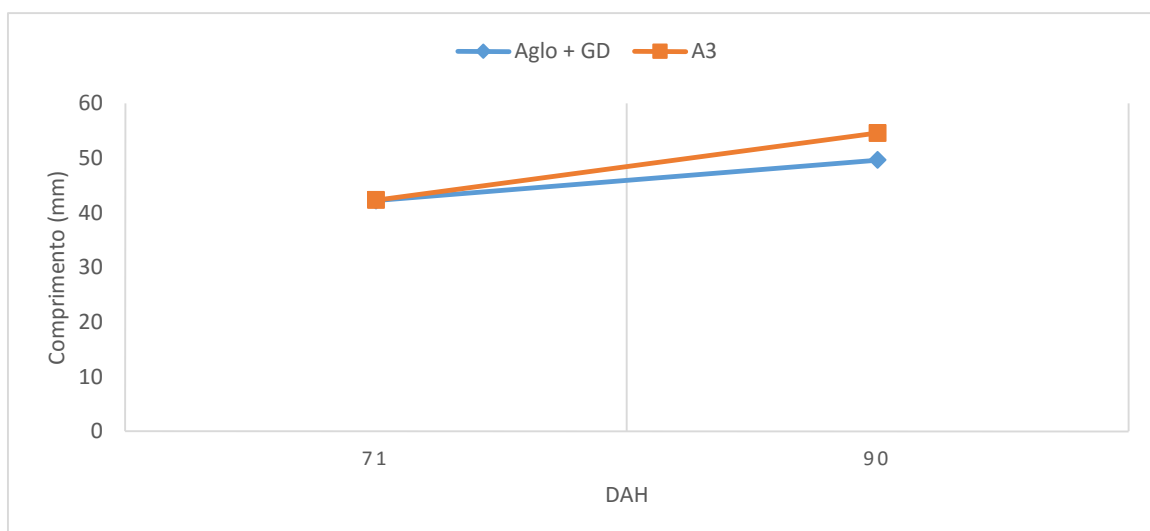


Gráfico 15 – Evolução do comprimento (mm) dos diferentes tratamentos

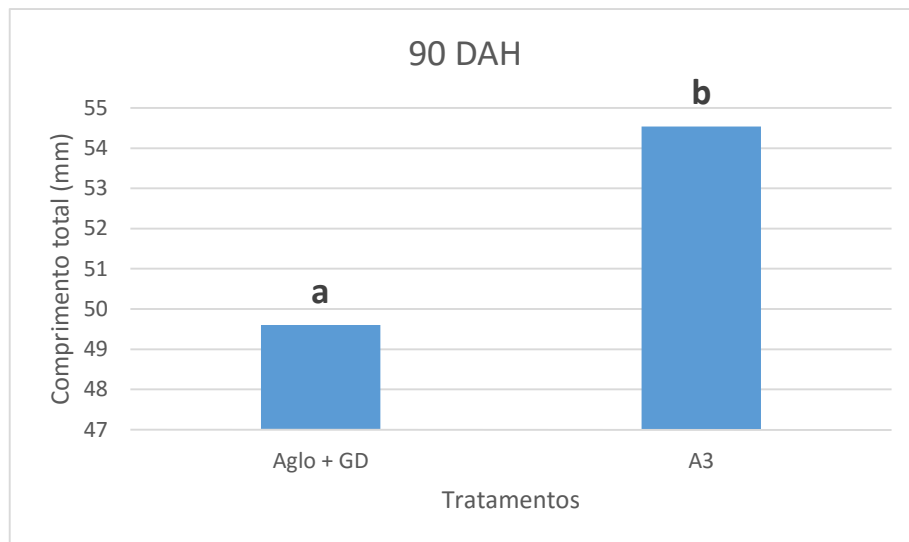


Gráfico 16 - Comprimento dos linguados (mm) aos 90 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

O número de larvas usado no início do ensaio foi determinado no final do ensaio. Para isso, no final do ensaio, o número de peixes por tanque foi determinado e a este juntou-se o número de peixes usados nas amostragens bem como o número total de mortos. O número inicial de peixes usado em cada tratamento foi o seguinte (Tabela 13):

Tabela 13 – Número de peixes iniciais por cada tanque

Dieta	Tanques	Nº de linguados
<b>Aglo + GD</b>	11	466
	12	491
	15	480
<b>A3</b>	10	475
	13	482
	14	487

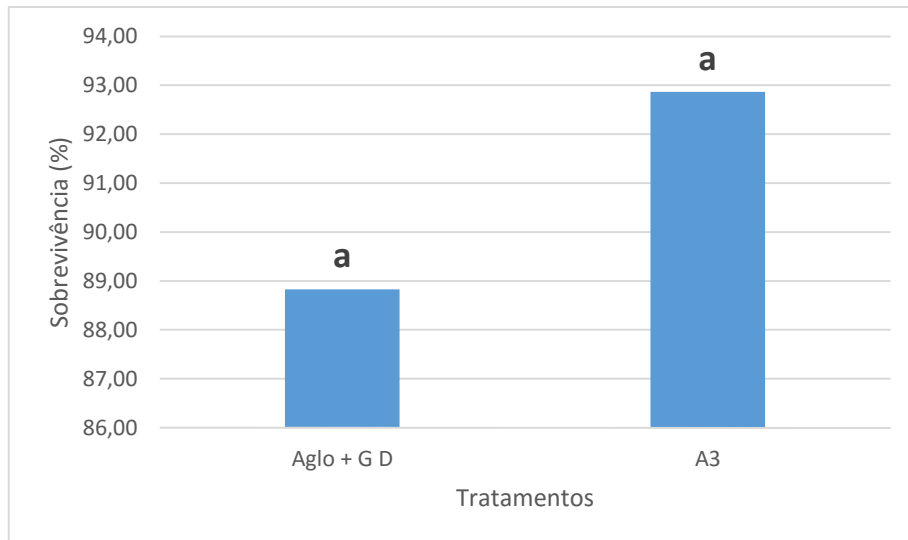


Gráfico 17 - Taxa de sobrevivência dos linguados para cada tratamento. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

Como demonstrado no Gráfico 17, não existiram diferenças significativas relativamente à taxa de sobrevivência entre os dois tratamentos. Na Tabela 14 encontram-se os valores de média e desvio padrão para a sobrevivência das larvas em cada tratamento.

Tabela 14 - Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos<sup>1</sup>.

Tratamentos	
Aglo + GD	A3
88,8±4,1 <sup>a</sup>	92,9±1,4 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p < 0.05$ ).

A taxa de conversão alimentar (FCR) estimado para cada tratamento revelou que a eficiência de utilização da dieta controlo é significativamente menor do que a da dieta A3 (Gráfico 18).

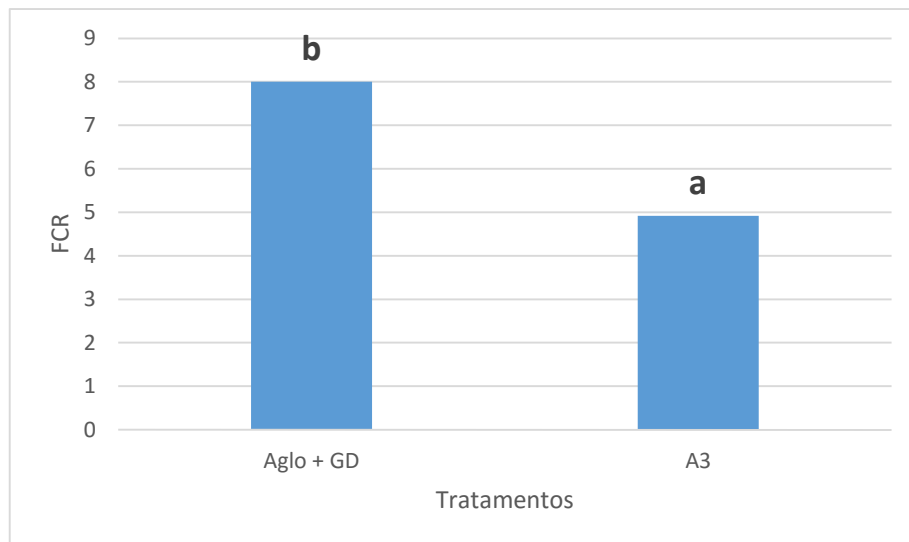


Gráfico 18 – Taxa de conversão alimentar (FCR) entre os diferentes tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

A taxa de crescimento relativa foi calculada e analisada estatisticamente. Muito embora a RGR dos linguados alimentados com a dieta A3 tenha sido maior do que com a dieta controlo, a diferença não foi significativa (Tabela 15).

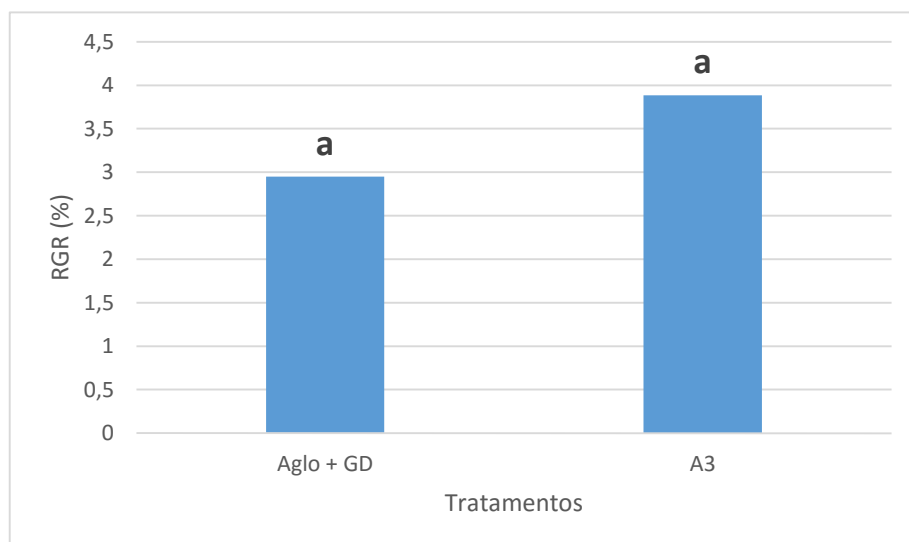


Gráfico 19 - Taxa de crescimento relativa (RGR; % dia<sup>-1</sup>) entre tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as dietas ( $p < 0.05$ ).

Tabela 15 – Média da taxa de crescimento relativa (RGR; % dia<sup>-1</sup>) das larvas de cada tratamento. <sup>1</sup>

Tratamentos	
Aglo + GD	A3
3±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,8 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si (p<0.05).

## Discussão

O aumento exponencial do uso de farinhas e óleos de peixe associado à diminuição dos *stocks* de peixes provenientes da pesca e ao seu elevado preço de mercado (devido à elevada procura e pouca oferta) são as principais razões para a urgente necessidade de procurar alternativas mais sustentáveis, tais como a substituição do óleo de peixe por óleo vegetal (Borges et al., 2014; Reis et al., 2014). A aquacultura sustentável passa, obrigatoriamente, pelo uso de dietas formuladas com base em ingredientes economicamente, socialmente e eticamente aceitáveis. No entanto, os óleos de peixes não entram nesta categoria. Na realidade, são necessários mais de 3-5 kg de peixe fresco por kg de peixe de aquacultura produzido, incorporado nas dietas na forma de farinha ou óleo de peixe, sendo uma prática insustentável a nível ambiental e económico (Torstensen et al., 2008). Esta problemática impõe o uso de fontes lipídicas alternativas em dietas para peixes. Alguns dos candidatos mais promissores são os óleos vegetais, dada a maior disponibilidade, estabilidade no mercado e preços mais baixos (Turchini et al., 2009; Reis et al., 2014).

No entanto, a diferente composição em ácidos gordos destes dois tipos de óleo, óleo de peixe versus óleos vegetais, nomeadamente no que se refere à ausência de ácidos gordos n-3 HUFA e ao elevado teor em outro tipo de ácidos gordos como os monossaturados, linoleico, linolénico (NRC, 2011) tem limitado a sua incorporação corrente em dietas para a aquacultura. De modo a fomentar o seu uso é, portanto, necessário um estudo criterioso do potencial efeito deste óleo na sobrevivência, performance, utilização do alimento, bem-estar e saúde nas diferentes fases do desenvolvimento do peixe (Turchini et al., 2009; NRC, 2011; Reis et al., 2014).

No presente ensaio, a substituição de óleos marinhos por níveis crescentes de óleos vegetais foi testada em larvas e juvenis de linguado senegalês. A avaliação do crescimento foi efetuada através do ganho de peso e de comprimento dos peixes. Aos 45 DAH não foram registadas diferenças entre os tratamentos experimentais, todavia o

comprimento dos peixes alimentados com um decrescente grau de substituição da dieta atrativa G e da dieta rica em óleos marinhos ( $G(V) + A2(V)$ ) e a dieta com moderada substituição de óleos marinhos ( $G + A3$ ) foi significativamente maior que com a dieta muito rica em óleos marinhos ( $G + A$ ) e a rica em óleos marinhos ( $G + A2$ ). No final do ensaio (70 DAH) o controlo foi o tratamento com a menor taxa de crescimento e o tratamento com menor nível de incorporação de óleo marinho (dieta  $G + A3$ ) o que promoveu maior taxa crescimento.

Os presentes resultados estão em linha com o observado para a mesma espécie, muito embora em diferentes fases de crescimento. Assim, em juvenis de linguado, Borges et al. (2014) testou a substituição total e de 50% de óleo de peixe por uma mistura de óleos vegetais, concluindo que a substituição do óleo de peixe não afetou significativamente o crescimento dos juvenis de linguado. Resultados similares foram obtidos por Reis et al. (2014) com a substituição parcial (50%) ou total (100%) de óleo de peixe por mistura de óleos vegetais, num ensaio de longa duração com linguados até que estes atingiram o tamanho comercial. Reis et al. (2014) referem que estes resultados podem dever-se à presença de farinha de peixe, e, portanto, de um nível adequado de óleo de peixe, presente na farinha de peixe. Uma vez que neste ensaio a farinha de peixe não foi substituída, esta poderá ser a razão dos resultados obtidos. Torstensen et al. (2008) verificaram que os tratamentos com maior substituição de farinha de peixe, mesmo quando o óleo de peixe era substituído em 35% e 70%, tinham um crescimento menor que os tratamentos em que a substituição de óleo de peixe era maior que a de farinha de peixe. Estes dados indicam que a farinha de peixe é o principal fator a influenciar o crescimento e não o óleo de peixe, ou seja, que o aporte em óleo de peixes via farinha de peixe é suficiente para suprir as necessidades, confirmando o que foi descrito para este ensaio e por Borges et al. (2014).

No caso da dourada e do robalo, quando alimentados com dietas com 80% ou 100% de substituição de óleo de peixe, os juvenis apresentaram um menor crescimento (Benitez-Dorta et al., 2013). O linguado senegalês apresenta baixa necessidade de LC-PUFA nas fases larvares e pós-larvares (Navarro-Guillen et al., 2014; Bonacic et al., 2015), principalmente uma baixa ou insignificante necessidade de DHA (Villalta et al., 2005). Como tal, as larvas de *Solea senegalensis* são capazes de crescer e sobreviver quando alimentadas com artémia não enriquecida com DHA, mas sendo necessário a presença de outros PUFA de cadeia n-3 (Morais et al., 2004; Villalta et al., 2005; Bonacic et al., 2015). Moraes et al. (2004) verificou que larvas alimentadas com artémia não enriquecida apresentavam um maior crescimento que larvas alimentadas com artémia enriquecida com Super HUFA®. Isto deve-se ao fato das larvas de linguado senegalês

estarem bem adaptadas para utilizar EPA como fonte primária de PUFA de cadeia n-3 (Villalta et al., 2005). Esta baixa necessidade de LC-HUFA, tal como DHA para as larvas de linguado pode ser uma razão da dieta A3, utilizada neste ensaio, ter melhores resultados. Como a dieta A3 tem uma substituição moderada de óleos marinhos, ainda apresenta na sua constituição ácidos gordos, nomeadamente EPA, que vai levar a uma maior taxa de crescimento, uma vez que larvas e pós-larvas de linguado senegalês não necessitam de DHA para que se verifique uma maior taxa de crescimento (Moraes et al., 2004; Villalta et al., 2005).

Foram verificadas diferenças significativas na sobrevivência dos diferentes tratamentos. Neste caso, o controlo obteve uma maior taxa de sobrevivência ( $93,8\% \pm 1,71$ ) embora significativamente igual a G(V) + A2(V) ( $92,21\% \pm 1,92$ ) e a G + A2 ( $87,11\% \pm 2,33$ ) que também foi significativamente igual aos restantes tratamentos. O tratamento G + A3 ( $86,69\% \pm 3$ ) foi significativamente igual a G + A ( $83,39\% \pm 0,68$ ), sendo o G + A3 o segundo tratamento com menor taxa de sobrevivência. Apesar da dieta com uma maior substituição de óleos marinhos obter um maior crescimento neste ensaio, a taxa de sobrevivência foi uma das piores. Isto indica que embora a dieta tenha todos os componentes para aumentar o crescimento do peixe, a utilização de óleo vegetal poderá ter levado a problemas de saúde e bem-estar nos indivíduos, bem como a elevados níveis de *stress*, o que conduziu a maiores mortalidades (Benitez-Dorta et al., 2013). Todavia, embora se verifiquem diferenças entre os tratamentos estas não foram muito elevadas, isto é, a maior taxa de sobrevivência foi de 93,8% comparativamente a 83,4% representando a menor taxa de sobrevivência.

A segunda parte do ensaio foi efetuada para verificar se os juvenis de *Solea senegalensis* alimentados com a dieta com moderada substituição de óleos marinhos continuavam a apresentar crescimentos maiores que o controlo, uma vez que os bons resultados desta dieta eram os mais procurados no início do ensaio. Os juvenis utilizados nesta parte do ensaio foram provenientes dos peixes maiores, obtidos pela triagem dos mesmos, da totalidade utilizada na primeira parte do ensaio. Não foram selecionados os peixes dos tratamentos que iriam continuar a ser testados, para que não se verificasse a influência das dietas anteriores.

No final do ensaio (90 DAH) a dieta A3 continuou a obter os melhores resultados de crescimento, tanto de peso seco como de comprimento. Desta forma, pode-se confirmar que o nível de farinha de peixe usado nesta dieta foi suficiente para complementar as necessidades em HUFA, provenientes do óleo de peixes aí existente, produzindo um maior crescimento (Torstensen et al., 2008; Borges et al., 2014; Reis et



al., 2014. A sobrevivência foi significativamente igual entre os tratamentos, todavia a dieta A3 obteve valores superiores ( $92,9\% \pm 1,38$ ) que o controlo ( $88,8\% \pm 4,11$ ). Benitez-Dorta et al. (2013) referiu que aos 90 DAH as diferentes dietas testadas não induziram diferenças na taxa de sobrevivência, indo de encontro ao presente ensaio. Relativamente à taxa de sobrevivência propriamente dita, este ensaio obteve valores superiores aos encontrados no estudo acima referenciado, que em média obteve uma sobrevivência de 85% em todos os tratamentos. Esta melhoria da taxa de sobrevivência, juntamente o grande crescimento dos juvenis alimentados com a dieta A3 demonstrou que esta dieta deve ser tida em conta para a alimentação do linguado senegalês.

Como a composição das dietas testadas não foram fornecidas, é difícil discutir os resultados obtidos neste ensaio. No entanto, pode-se concluir que, em dietas com o mesmo teor lipídico, os níveis de inclusão de óleos de marinhos influencia a sobrevivência e o crescimento das larvas e juvenis de linguados. No presente estudo o nível mais baixo de incorporação destes óleos marinhos foi o que levou a melhores resultados. Outros estudos terão de ser efetuados para perceber o porquê destes resultados, nomeadamente o estudo do estado oxidativos dos linguados alimentados com dietas com elevado teor em óleos marinhos.

#### IV – Ensaio 2: Avaliação de diferentes regimes alimentares de larvas de linguado senegalês (*Solea senegalensis*)

## Introdução

O linguado senegalês (*Solea senegalensis*) é uma espécie com grande potencial na indústria de aquacultura, todavia existem poucos dados sobre as condições de acondicionamento das larvas e a melhor estratégia de desmame (Cañavate et al., 1999; Engrola et al., 2005; Engrola et al., 2007; Mai et al., 2009; Engrola et al., 2010). É importante a utilização de estratégias de desmame adequadas, uma vez que as larvas apresentam grandes taxas de crescimento comparativamente a peixes de maiores dimensões. Como tal, um adequado desmame, utilizando uma alimentação equilibrada e tendo em conta as necessidades nutricionais das larvas, leva a um maior crescimento dos peixes, a uma maior eficiência de conversão alimentar e um aumento da sobrevivência (Engrola et al., 2009a).

Atualmente, a produção de larvas baseia-se na utilização de alimento vivo durante um longo período de tempo (Rosenlund et al., 1997; Cañavate et al., 1999; Cahu et al., 2001; Infante et al., 2001; Kolkovski, 2001; Engrola et al., 2009a; Engrola et al., 2010), havendo a necessidade de manter um *stock* de culturas vivas de artémia e de rotíferos durante todo o ano (Cahu et al., 2001; Infante et al., 2001; Kolkovski, 2001; Engrola et al., 2010), aumentando os custos de produção (Rosenlund et al., 1997; Cahu et al., 2001). Além disso, o perfil nutricional do alimento vivo não é o mais adequado às larvas de modo a garantir taxas de crescimento otimizadas, sendo necessário recorrer ao enriquecimento das culturas vivas (Infante et al., 2001; Engrola et al., 2010). No entanto, alguns estudos sugerem que, para além do perfil nutricional, o alimento vivo pode fornecer outros fatores que estimulam certas respostas endócrinas, através do estímulo de secreções pancreáticas das larvas (Infante et al., 2001). Assim, neste contexto, a substituição do alimento vivo por alimento inerte permitiria uma melhoria económica, uma vez que o alimento inerte é mais barato e fácil de usar, além de ser um alimento com uma composição mais estável e rigorosa que o alimento vivo (Engrola et al., 2009a). O comportamento alimentar das larvas de linguado é um comportamento de predação de alimento vivo, como rotíferos e artémia, o que representa um desafio na introdução da alimentação inerte, nesta fase (Engrola et al., 2005; Engrola et al., 2007). Fernández-Días (1994) estudou o comportamento alimentar das larvas de dourada, tendo observado que quando sujeitas a co- alimentação as larvas davam preferência à captura das presas em detrimento do alimento inerte. Outro desafio na adequação da fórmula das dietas inertes para larvas de peixes é a falta de conhecimento científico sobre as necessidades nutricionais das larvas, não sendo possível extrapolar as suas

necessidades a partir das necessidades dos juvenis, pois as larvas têm necessidades muito específicas, o que levaria à redução de crescimento das larvas (Cahu et al., 2001).

O desmame é uma etapa crítica da produção de linguados em aquacultura e pode ser feito subitamente, ou seja, terminando a alimentação com alimento vivo e iniciando a introdução de alimento inerte; ou então, através da co-alimentação, utilizando alimento vivo e inerte (Engrola et al., 2009b; Mai et al., 2009). Um regime de co-alimentação pode melhorar e estabilizar a nutrição das larvas, facilitando a aceitação de dietas inertes e diminuindo o período de desmame (Rosenlund et al., 1997; Cañavate et al., 1999), sendo esta estratégia alimentar proposta para diferentes espécies produzidas, como o robalo asiático, o bacalhau do Atlântico e o alabote do Atlântico (Engrola et al., 2009b; Engrola et al., 2010). Segundo o descrito por Mai et al. (2009) para o linguado senegalês, a co-alimentação com elevada substituição de artémia provocou a diminuição da digestibilidade e da retenção de proteínas, todavia, quando a substituição foi moderada verificou-se a adaptação do metabolismo das proteínas, promovendo o crescimento no final do desmame. No entanto, é necessário ter em conta que a maturação intestinal pode ser estimulada ou irreversivelmente afetada dependendo de como é realizada a co-alimentação (Engrola et al., 2009b; Engrola et al., 2010), daí a maturação intestinal ser um fator importante para avaliar as necessidades nutricionais e para desenvolver protocolos alimentares adequados para as larvas, uma vez que o tipo de dieta inerte durante o desmame pode atrasar ou promover a maturação do sistema digestivo e provocar mortalidades, tanto no linguado senegalês como noutras espécies (Infante et al., 2001; Engrola et al., 2009a; Engrola et al., 2010). Por tais motivos, a maturação do sistema digestivo e a capacidade digestiva têm sido estudadas para diferentes regimes de co-alimentação, verificando-se uma relação positiva em *Solea senegalensis* e *Salminus brasiliensis* (Engrola et al., 2010).

O fraco desempenho das larvas, quando alimentadas com dietas inertes à abertura da boca, deve-se à dificuldade de formulação de dietas com composição apropriada para as necessidades nutricionais das larvas, bem como devido à fraca capacidade que estas possuem para modular as suas enzimas digestivas (Rosenlund et al., 1997; Engrola et al., 2009a; Engrola et al., 2009b). No bacalhau do Atlântico, na dourada branca e em *Sharpsnout seabream*, a mudança da composição da dieta levou a impactos diretos nos perfis de enzimas digestivas (Engrola et al., 2009a). Todavia, o desenvolvimento de uma dieta inerte que seja bem ingerida, digerida e assimilada pelas larvas quando fornecida à abertura da boca, tem sido um dos grandes objetivos para o desmame de larvas (Engrola et al., 2007; Engrola et al., 2009a), uma vez que para se verificar o crescimento das larvas estas necessitam de se alimentar e serem capazes

de digerir o alimento (Engrola et al., 2010). Alguns resultados referidos por Engrola et al. (2007) demonstram que existe um menor crescimento das larvas quando estas são alimentadas com dietas inertes muito cedo, devido à falta de atração e digestibilidade destas dietas. Para que a co-alimentação seja bem-sucedida é importante que as larvas se alimentem com dietas inertes quando o alimento vivo está presente (Rosenlund et al., 1997).

Também a frequência da alimentação influencia o crescimento das larvas. Uma grande frequência de alimentação induz um maior crescimento, tanto em larvas como em juvenis, principalmente antes do início do desmame. Neste sentido, a maioria das empresas que produzem larvas fornecerem alimento vivo várias vezes por dia ou continuamente, uma vez que as taxas de crescimento podem ser limitadas pela disponibilidade de alimentação (Engrola et al., 2005). Ao aumentar a frequência de alimentação, além de melhorar a taxa de crescimento, diminui a dispersão de tamanhos entre lotes, como verificado em *Coregonus lavaretus* e *Rhombosolea tapirina* (Engrola et al., 2005). No entanto, uma maior frequência de alimentação, antes do desmame, produz peixes maiores, mas em menor número devido às mortalidades apresentadas (Engrola et al., 2007). Por esses motivos, a quantidade, a frequência e a qualidade de alimentação fornecida às larvas, tanto viva como manufaturada, é importante para o crescimento, sobrevivência e sucesso do desmame (Cañavate et al., 1999).

O desmame do linguado senegalês é uma fase crítica do desenvolvimento desta espécie, no qual o regime alimentar a ser adotado é uma das principais preocupações. Tanto o crescimento como a sobrevivência são os critérios mais utilizados para verificar se um regime alimentar é o mais adequado (Cañavate et al., 1999; Engrola et al., 2007; Engrola et al., 2009a; Engrola et al., 2009b).

Neste contexto foi realizado um ensaio para avaliar a taxa de sobrevivência e a de crescimento de linguados (*Solea senegalensis*) sujeitos a diferentes protocolos alimentares durante o desmame. Os protocolos alimentares testados incluem: 1) co-alimentação à abertura da boca; 2) co-alimentação após a metamorfose, ou seja, aquando o aparecimento de larvas bentónicas, comparativamente com 3) desmame abrupto aos 32 DAH, tal como se procede na empresa.

## Materiais e Métodos

Este ensaio, designado SOLEW 155, foi realizado durante o estágio na Safiestela. Este decorreu entre 18 de Março e 15 de Maio de 2015. As larvas provenientes da mesma desova foram divididas por 9 tanques cilíndrico-cónicos com uma capacidade de 200l, formando três réplicas por tratamento. Em cada tanque foram distribuídas as larvas perfazendo uma densidade de 15 larvas por litro, isto é, 3000 larvas por tanque. As larvas foram colocadas nos tanques aos 2 DAH e o ensaio durou até aos 61 DAH. No início do ensaio foram recolhidas 30 larvas para determinação do comprimento individual e 90 larvas para determinação do peso. Após a amostragem foram adicionados 2 M (milhões) rotíferos por ml, tal como é feito nas instalações onde foi realizado o ensaio. Foi colocado um filtro na saída de água com 500 µm e arejamento franco, com uma pedra difusora que permanecia no fundo do tanque. O caudal foi de 1 renovação por hora.

Foram testados 3 tratamentos, em triplicado, em que se fez variar a idade da introdução da dieta inerte, como indicado na Tabela 16. A dieta inerte utilizada (dieta G4) foi a mesma para os tratamentos de co-alimentação. No grupo controlo não houve co-alimentação e foi usada a dieta atualmente em uso na empresa.

Tabela 16 – Introdução do alimento inerte de cada tratamento

Tratamento	Idade de introdução do alimento inerte
<b>G4MO</b>	Introdução da dieta G4 à abertura da boca (2 DAH).
<b>G4BENT</b>	Introdução da dieta G4 após a metamorfose
<b>Controlo</b>	Introdução da dieta controlo (usada na empresa) aos 32 DAH

A dieta G4 é uma dieta de desmame de elevada qualidade, e cuja sua composição proximal é apresentada e pode ser verificada na Tabela 17. Esta dieta foi formulada e preparada pela Sparos Lda.

Tabela 17 - Composição proximal da dieta G4 utilizada no ensaio

Dieta	Matéria seca (DM,%)	Cinza (%DM)	Proteína (%DM)	Gordura (%DM)	Energia (kj/g) - %DM	Fósforo (%DM)
G4	93,2	13,4	67,3	15,9	23,	2,2

Desde o início do ensaio até aos 6 DAH foi fornecida alga (*Nannochloropsis oculata*) antes de se acenderem as luzes da sala onde se encontravam os tanques. O fornecimento da alga tinha como objetivo diminuir o stress sempre que as luzes da sala eram acesas, bem como servir de alimento aos rotíferos fornecidos às larvas. O plano alimentar de cada tratamento até ao final da metamorfose, que se verificou aos 14 DAH, encontra-se sumariado na Tabela 18.

Diariamente foram retiradas amostras de água de cada tanque, às 8h30 e às 12h30, com o objetivo de verificar a quantidade de alimento vivo que se encontrava dentro dos tanques. A essa quantidade era adicionada, quando necessário, a quantidade de alimento vivo para que o volume de presas permanecesse o mesmo ao referido no protocolo alimentar (Tabela 18). Em todos os tratamentos, o alimento vivo foi adicionado 4 vezes por dia, às 9h00, 13h00, às 17h00 e 21h00. Como tal, a quantidade de alimento vivo a ser fornecido às 17h00 e às 21h00 foi a média da quantidade adicionada durante as duas primeiras contagens. No caso de não se verificar a necessidade de adição de alimento durante as duas primeiras tomas, foi fornecido metade da concentração de alimento estipulado, tanto às 17h00 como às 21h00. A dieta inerte fornecida no tratamento G4MO, foi adicionada 2 vezes por dia até aos 6 DAH, uma hora antes da alimentação com alimento vivo (às 8h00 e às 16h00), e dos 6 DAH até aos 14 DAH foi fornecida 4 vezes por dia, às 8h00, 12h00, 16h00 e 20h00. A quantidade total de ração indicada na Tabela 17 diz respeito à quantidade total diária de alimento inerte fornecido. A granulometria da dieta, nesta fase foi de 200-400 µm.

Tabela 18 – Quantidade de alimento vivo e inerte fornecido em cada tratamento até aos 14 DAH \*

Idade	Tratamentos experimentais			
	G4MO		G4BENT	Controlo
	Alimento vivo (M/ml)	Dieta G4 (g)	Alimento vivo (M/ml)	Alimento vivo
3 DAH	Rotíferos - 2	0,5	Rotíferos - 2	Rotíferos
4 DAH	Rotíferos - 2	0,7	Rotíferos - 2	Rotíferos
5 DAH	Rotíferos – 2 Artémia AF – 0,5	0,9	Rotíferos – 2 Artémia AF – 0,5	Rotíferos Artémia AF
6 DAH	Rotíferos – 2 Artémia AF – 0,5	1	Rotíferos – 2 Artémia AF – 0,5	Rotíferos Artémia AF
7 DAH	Rotíferos – 2 Artémia AF – 0,5	1,2	Rotíferos – 2 Artémia AF – 0,5	Rotíferos Artémia AF
8 DAH	Artémia AF – 0,5 Artémia EG – 0,5	1,4	Artémia AF – 0,5 Artémia EG – 0,5	Artémia AF Artémia EG
9 DAH	Artémia AF – 0,5 Artémia EG – 0,75	1,6	Artémia AF – 0,5 Artémia EG – 0,75	Artémia AF Artémia EG
10 DAH	Artémia EG – 1	1,8	Artémia EG – 1	Artémia EG
11 DAH	Artémia EG – 1,5	2,5	Artémia EG – 1,5	Artémia EG
12 DAH	Artémia EG – 1,5	2,5	Artémia EG – 1,5	Artémia EG
13 DAH	Artémia EG – 1,5	3	Artémia EG – 1,5	Artémia EG
14 DAH	Artémia EG – 1,5	3,5	Artémia EG – 1,5	Artémia EG

\*A quantidade de alimento vivo fornecida no grupo controlo não é demonstrada devido a sigilo com a empresa.

Aos 15 DAH as larvas foram transferidas para o sistema de tanques utilizado no primeiro ensaio. As larvas foram retiradas dos tanques cilíndrico-cónicos por sifonagem, e quando necessário, utilizando a válvula que se encontrava na parte inferior dos tanques. Os tanques de destino, com uma capacidade de 20l, permaneceram com um caudal de 1 renovação por hora. Nesta etapa deveriam ser colocadas somente 1000 larvas por tanque, contudo, para que não se verificassem elevadas mortalidades devido ao manuseamento das larvas, estas foram colocadas na sua totalidade em cada tanque, ou seja, 3000 larvas por tanque.

A alimentação inerte foi fornecida (tratamentos G4MO e G4BENT) pelos alimentadores de tapete, colocados nos tanques e o alimento vivo foi fornecido de 2 em



2 horas com início às 9h00. A granulometria da dieta G4, entre os 15 e aos 16 DAH, foi de 50% de 200-400 µm e 50% de 400-600 µm e a partir do dia 17 DAH até ao final do ensaio, de 400-600 µm.

O alimento vivo fornecido, a partir do dia 15 DAH, foi somente composto por artémia EG. No controlo, a artémia foi fornecida até aos 30 DAH, durante todo o dia, segundo o protocolo da empresa, sendo que aos 31 DAH só se alimentaram até as 19h00, seguindo-se uma fase de jejum até ao dia seguinte, sendo iniciada a introdução da ração inerte. Na Tabela 19 está representada a alimentação de todos os tratamentos experimentais entre os 15 e os 31 DAH.

Tabela 19 – Quantidade de alimento vivo e inerte fornecido em cada tratamento até aos 31 DAH\*

Idade	Tratamentos				
	G4MO		G4BENT		Controlo
	Alimento vivo (M/ml)	Diet a G4 (g)	Alimento vivo (M/ml)	Dieta G4 (g)	Alimento vivo (M/ml)
15 DAH	Artémia EG – 1,5	4	Artémia EG – 1,5	4	Artémia EG
16 DAH	Artémia EG – 1,5	4	Artémia EG – 1,5	4	Artémia EG
17 DAH	Artémia EG – 1,5	4,5	Artémia EG – 1,5	4,5	Artémia EG
18 DAH	Artémia EG – 2	4,5	Artémia EG – 2	4,5	Artémia EG
19 DAH	Artémia EG – 2	5	Artémia EG – 2	5	Artémia EG
20 DAH	Artémia EG – 2,5	5	Artémia EG – 2,5	5	Artémia EG
21 DAH	Artémia EG – 2,5	5,5	Artémia EG – 2,5	5,5	Artémia EG
22 DAH	Artémia EG – 2	6	Artémia EG – 2	6	Artémia EG
23 DAH	Artémia EG – 2	7	Artémia EG – 2	7	Artémia EG
24 DAH	Artémia EG – 1	8	Artémia EG – 1	8	Artémia EG
25 DAH		8		8	Artémia EG
26 DAH		9		9	Artémia EG
27 DAH		9		9	Artémia EG
28 DAH		10		10	Artémia EG
29 DAH		11		11	Artémia EG
30 DAH		11,5		11,5	Artémia EG
31 DAH		12		12	Artémia EG

\*A quantidade de alimento vivo fornecida no grupo controlo não é demonstrada devido a sigilo com a empresa.

Até aos 45 DAH foi fornecida Aglonorse e, a partir deste dia, Gemma Diamond até ao final do ensaio, no tratamento controlo. Os tratamentos G4MO e G4BENT foram co-alimentados com dieta inerte e alimento vivo até as 24 DAH. Dos 15 DAH até aos 21 DAH, a quantidade de alimento vivo foi igual ao fornecido no tratamento controlo, contudo, nos dias seguintes a quantidade decresceu. Aos 25 DAH as larvas começaram a ser alimentadas somente com a dieta inerte.

Aos 30 DAH cada tratamento foi junto, formando uma *pool*, de forma a redistribuir as larvas novamente pelos tanques, mas desta vez somente colocando 1000 larvas por tanque e a renovação de água foi colocada a 2 renovações por hora. Desde que as larvas foram colocadas nos tanques de 20l (15 DAH) até ao final do ensaio, foi efetuada a limpeza dos tanques, com a ajuda de uma escova e retirados os indivíduos mortos ou com sinais de debilidade. Quando se verificava elevadas mortalidades, o tanque em causa era tratado com formol, de forma a evitar proliferações de doenças. Uma vez que, ao longo do ensaio foi verificado um aumento da mortalidade, o aparecimento de doenças e uma diminuição da ingestão voluntária (a dieta fornecida não era ingerida e acumula-se no fundo dos tanques), decidiu-se terminar o ensaio mais cedo. Assim, em vez do ensaio terminar aos 80 DAH, conforme planeado inicialmente, finalizou-se aos 61 DAH.

Durante o ensaio foram realizadas diversas amostragens, sendo retiradas fotografias a 30 larvas para avaliação do comprimento, utilizando o programa Axio Vision Rel. 4.8, e guardadas individualmente a -18 °C para, posterior quantificação do peso seco. As amostragens decorreram aos 15, 25, 32, 45 e 61 DAH. No final do ensaio, aos 61 DAH, os juvenis foram retirados dos tanques e triados com uma rede de 6 mm para que fossem divididos em peixes grandes e pequenos e, de seguida, contabilizados, para obtenção do número final de peixes em cada tanque. Os peixes retirados para amostragem, no fim do ensaio, foram dos peixes maiores, uma vez que a fragilidade dos tanques era elevada, e daí não se contabilizar os peixes subnutridos.

## Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados de forma a obter a média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada tanque e tratamento. Foi, ainda, determinado o fator de conversão alimentar (FCR), a taxa de crescimento relativa (RGR) e a sobrevivência. Estes valores, juntamente com os obtidos em todas as amostragens, foram analisados por comparação de médias, aplicando ANOVA, com um grau de significância de 0,05.

Quando não se verificaram os pressupostos de normalidade e de homogeneidade de variâncias da ANOVA, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com um grau de significância de 0,05.

## Cálculos

### Peso Húmido

$$\text{Peso Húmido} = \text{Peso Seco} / 0,2$$

(assumindo que as larvas são constituídas por 80% de água)

### Taxa de Crescimento Relativo

$$\text{RGR} = (e^g - 1) \times 100$$

(em que  $g = [\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}) \times \text{tempo}^{-1}]$ )

### Sobrevivência

$$\% \text{ sobrevivência} = 100 - (\text{Mortalidade} / \text{número de peixes inicial} \times 100)$$

### Taxa de conversão alimentar

$$\text{FCR} = \text{alimento consumido (g)} / \text{aumento da biomassa (g)}$$

## Resultados

Na Tabela 20 é apresentado o peso seco e o comprimento individual dos linguados submetidos aos diferentes regimes alimentares, ao longo do ensaio experimental. As médias apresentadas, bem como o desvio padrão foram calculados através dos valores obtidos por cada peixe, de cada um dos triplicados de cada tratamento.

Tabela 20 – Crescimento médio dos linguados submetidos aos diferentes protocolos alimentares 2, 15, 25, 32, 45 e 61 DAH \*

Peso Seco (mg)	Tratamentos		
	G4MO	G4BENT	CONTROLO
2 DAH	0,03±0,001 <sup>a</sup>	0,03±0,001 <sup>a</sup>	0,03±0,001 <sup>a</sup>
15 DAH	0,6±0,2 <sup>a</sup>	0,7±0,3 <sup>b</sup>	0,8±0,3 <sup>c</sup>
25 DAH	3,9±1,6 <sup>a</sup>	5,4±1,4 <sup>b</sup>	5,8±2,1 <sup>b</sup>
32 DAH	9,1±6,9 <sup>a</sup>	12±3,11 <sup>b</sup>	15,4±5,4 <sup>c</sup>
45 DAH	21,9±13 <sup>a</sup>	29,3±11,8 <sup>b</sup>	24,4±11,7 <sup>a</sup>
61 DAH	94±30,1 <sup>a</sup>	124±34,5 <sup>c</sup>	108,7±24,7 <sup>b</sup>
<b>Comprimento total (mm)</b>			
2 DAH	3,2±0,03 <sup>a</sup>	3,2±0,03 <sup>a</sup>	3,2±0,03 <sup>a</sup>
15 DAH	6,5±1,1 <sup>a</sup>	6,6±1,2 <sup>a</sup>	7,3±1,1 <sup>b</sup>
25 DAH	12,9±1,9 <sup>a</sup>	14,6±1,2 <sup>b</sup>	14,4±2 <sup>b</sup>
32 DAH	17,4±3,1 <sup>a</sup>	20±1,7 <sup>b</sup>	20,3±2,6 <sup>c</sup>
45 DAH	23,2±4,4 <sup>a</sup>	25,7±3,3 <sup>b</sup>	23,4±3,7 <sup>a</sup>
61 DAH	36,2±3,7 <sup>a</sup>	39±3,8 <sup>c</sup>	38±2,8 <sup>b</sup>

\*Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si (p<0.05).

\*2 DAH corresponde ao primeiro dia e 61 DAH ao final do ensaio

No Gráfico 20 apresenta-se a evolução de peso seco dos linguados dos diferentes tratamentos, desde os 2 DAH até ao final do ensaio. Uma vez que aos 2 DAH os peixes foram obtidos do mesmo lote, não se verificaram diferenças entre os tratamentos.

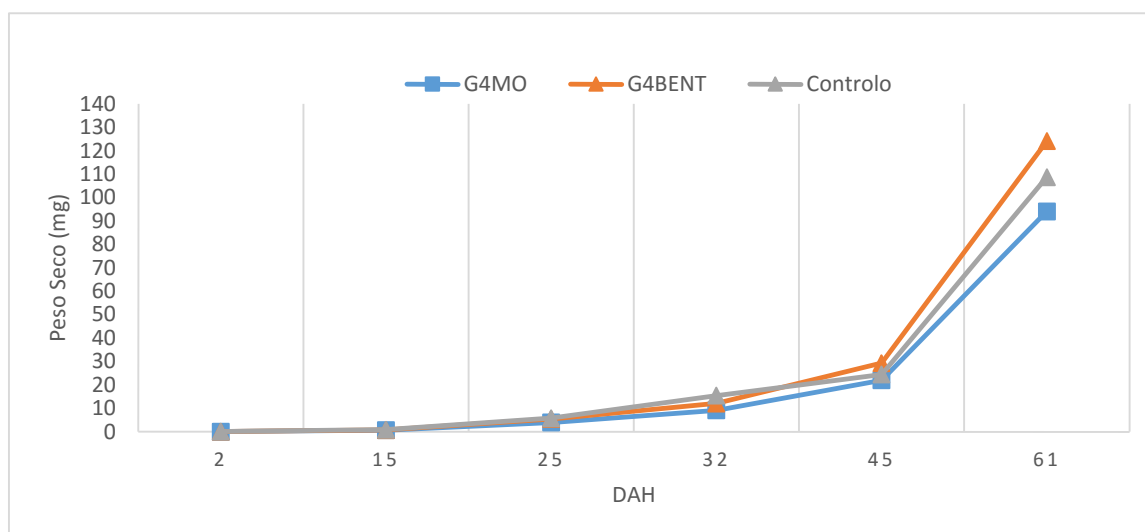


Gráfico 20 – Evolução do peso (mg peso seco) dos diferentes tratamentos

Para a análise estatística destes dados, foi realizado o teste ANOVA, com uma significância de 0,05 na amostragem dos 45 DAH. Nas restantes amostragens, como não se verificou homogeneidade de variâncias, mesmo com a transformação logarítmica dos valores, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para verificar se existiam diferenças significativas entre tratamentos. Seguidamente seguem os gráficos com as diferenças entre tratamentos, em cada uma das amostragens (Gráficos 21, 22, 23, 24 e 25).

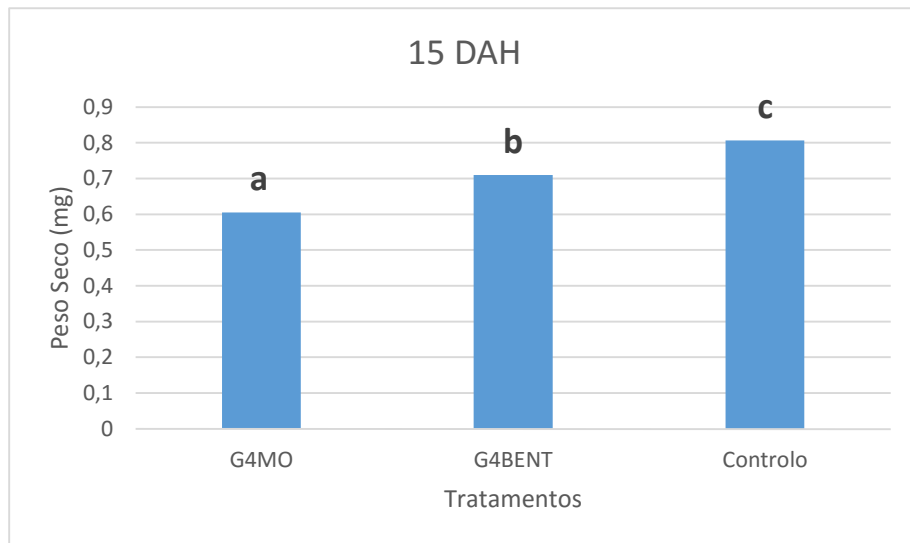


Gráfico 21 - Peso dos linguados (mg peso seco) aos 15 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

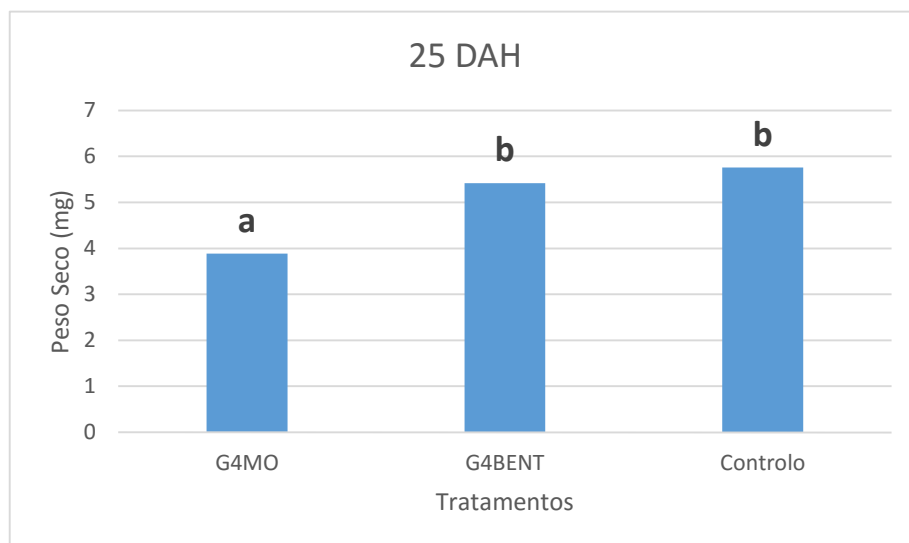


Gráfico 22 - Peso dos linguados (mg peso seco) aos 25 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

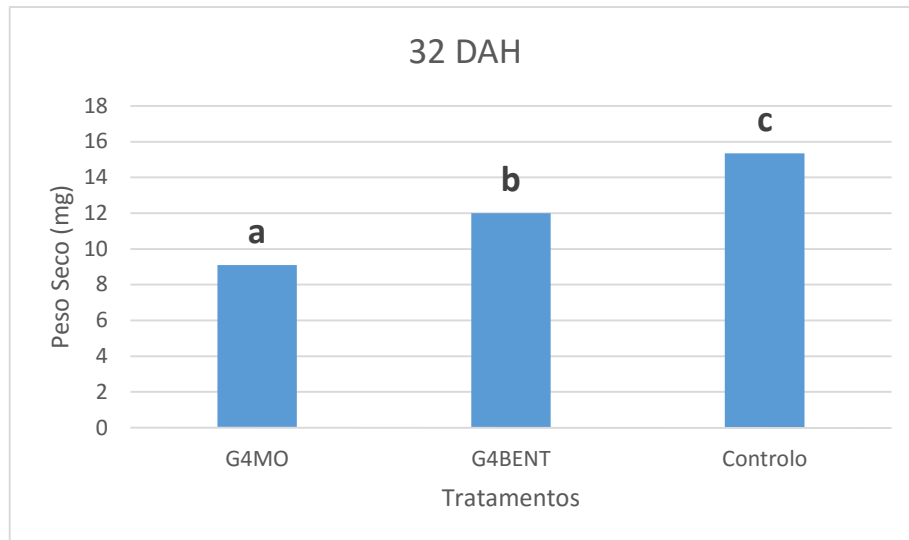


Gráfico 23 - Peso dos linguados (mg peso seco) aos 32 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

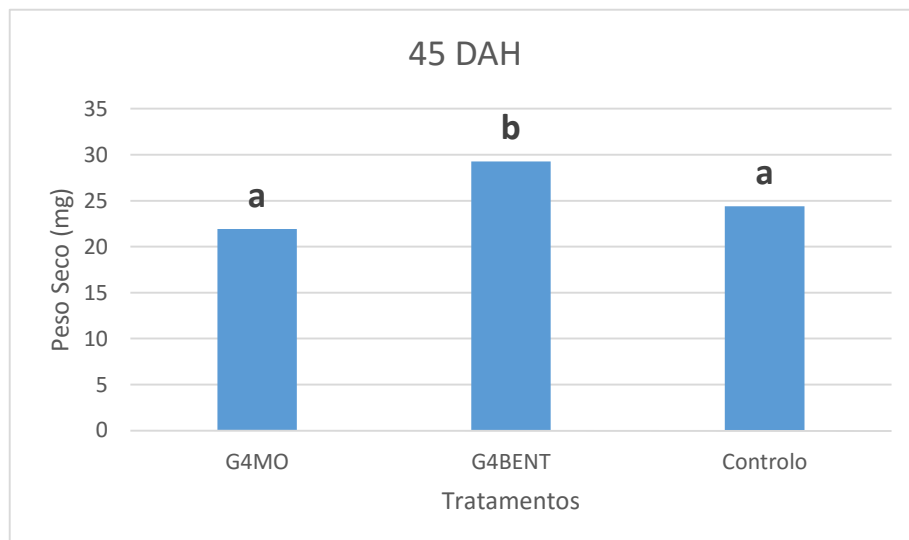


Gráfico 24 - Peso dos linguados (mg peso seco) aos 45 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

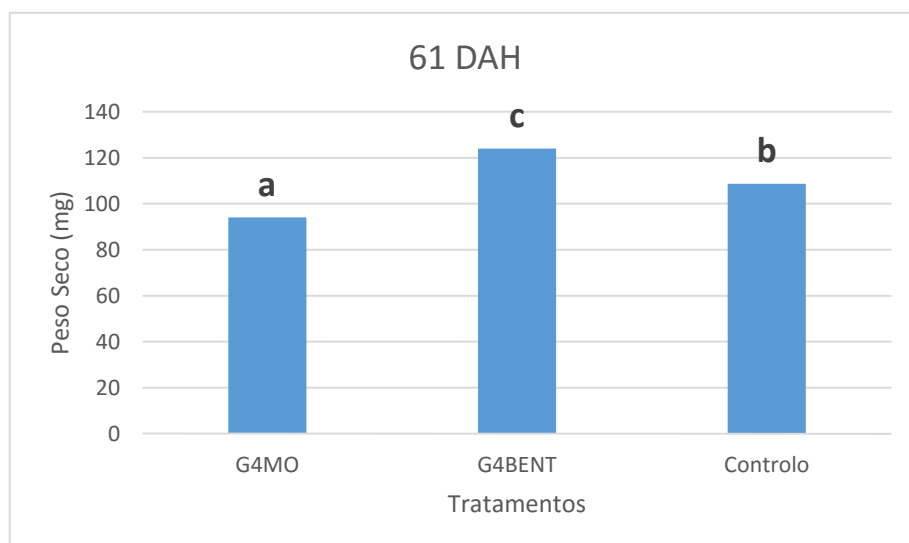


Gráfico 25 - Peso dos linguados (mg peso seco) aos 61 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

Verifica-se que o protocolo alimentar afetou significativamente o peso dos linguados aos 15, 25, 32 e 61 DAH. Aos 15 e 32 DAH verifica-se que o grupo controlo e o grupo G4MO registam o maior e o menor peso seco, respetivamente. Aos 25 DAH não se verificam diferenças entre o controlo e o G4BENT, embora ambos sejam significativamente maiores que o G4MO. Aos 45 DAH, o tratamento G4MO e o controlo foram semelhantes e estatisticamente menores do que o tratamento G4BENT, e no final do ensaio, aos 61 DAH, o peso seco do grupo G4BENT continuou a ser o tratamento com valor mais alto, seguido do controlo e do G4MO, verificando-se diferenças significativas entre todos.

No Gráfico 26 está demonstrada a evolução em comprimento total de todos os tratamentos durante o ensaio.

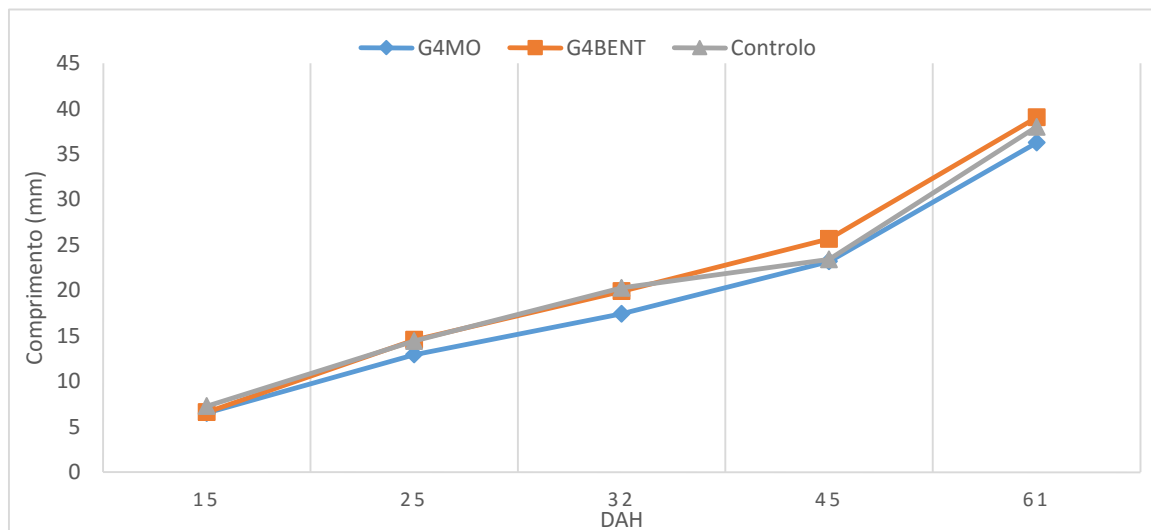


Gráfico 26 – Evolução do comprimento (mm) dos diferentes tratamentos

Para a análise estatística foi utilizada a ANOVA para a amostragem aos 15 DAH, uma vez que se verificava homogeneidade de variâncias. Nas restantes amostragens foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Aos 2 DAH os peixes foram obtidos do mesmo lote, como tal não se verificam diferenças entre os tratamentos. As diferenças entre tratamentos, em cada amostragem está representada nos gráficos que se seguem (Gráfico 27, 28, 29, 30 e 31).

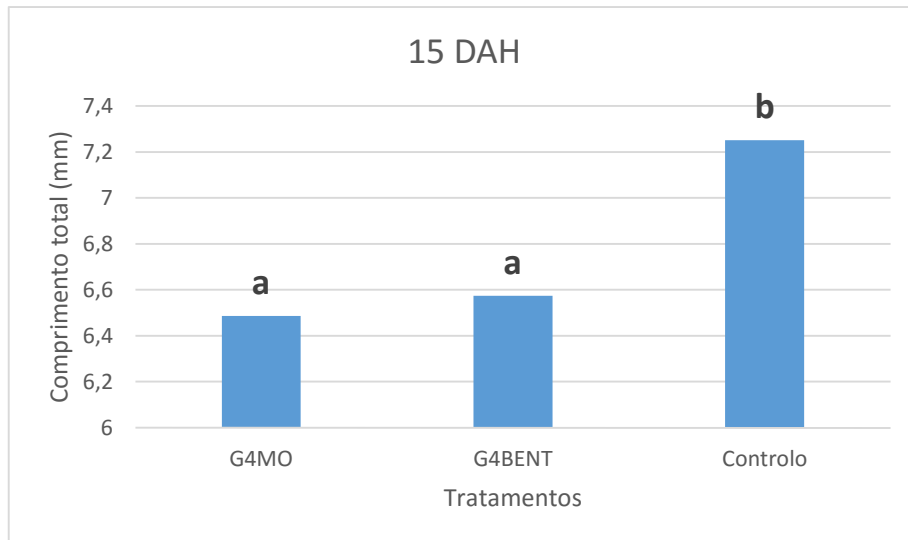


Gráfico 27 – Comprimento dos linguados (mm) aos 15 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

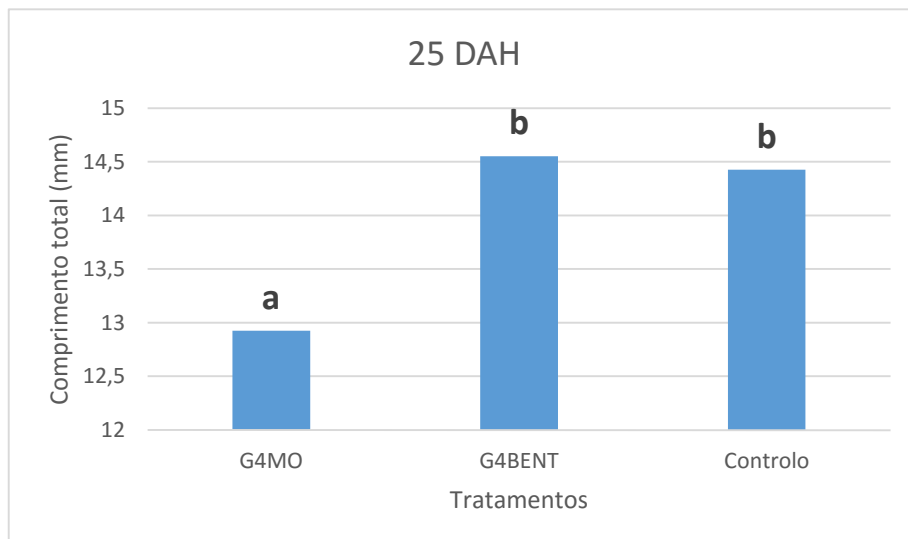


Gráfico 28 - Comprimento dos linguados (mm) aos 25 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

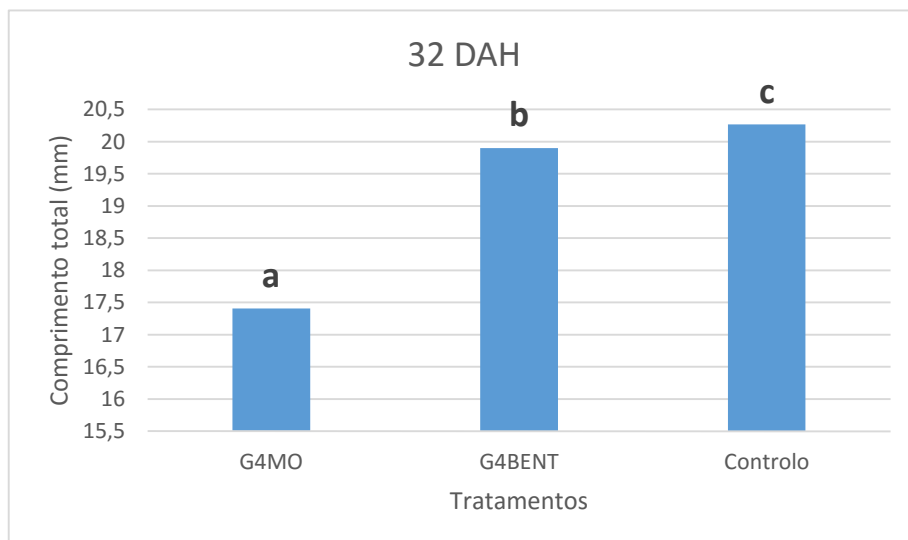


Gráfico 29 - Comprimento dos linguados (mm) aos 32 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).



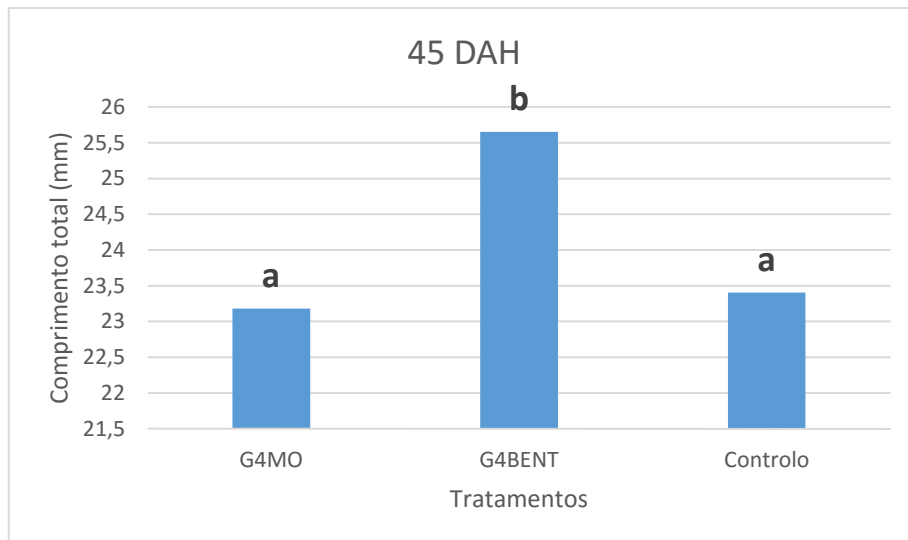


Gráfico 30 - Comprimento dos linguados (mm) aos 45 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

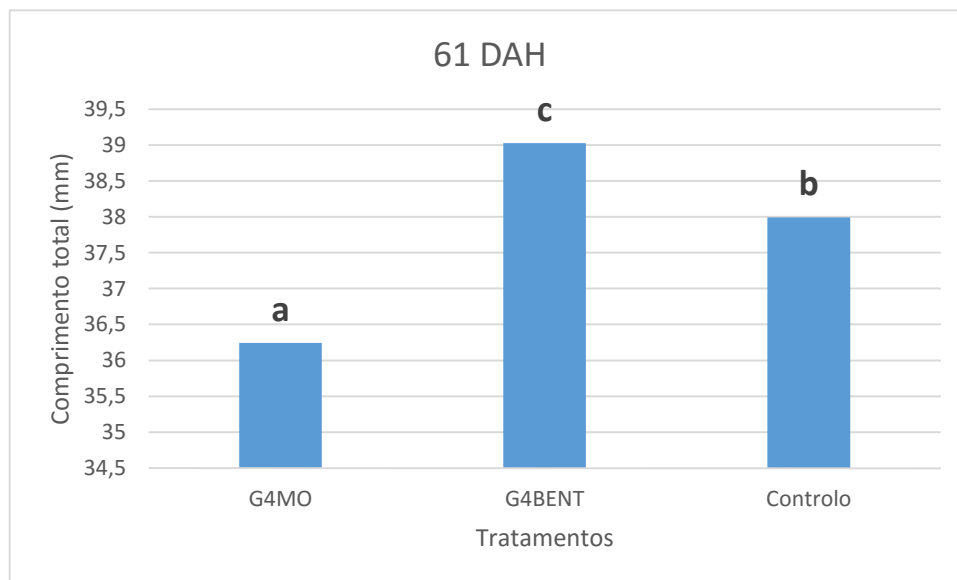


Gráfico 31 - Comprimento dos linguados (mm) aos 61 DAH. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

Aos 15 DAH não se verificam diferenças significativas entre o tratamento G4MO e o G4BENT, embora ambos sejam significativamente inferiores ao grupo controlo. Aos 25 DAH, o G4BENT foi semelhante ao controlo, e significativamente superiores ao tratamento G4MO. Na amostragem feita aos 32 DAH, observou-se diferenças significativas entre todos os tratamentos, sendo o controlo com as larvas de maiores dimensões e o G4MO com as larvas de menores dimensões. Aos 45 DAH, o comprimento dos linguados do tratamento controlo foi semelhante ao do G4MO, mas significativamente inferior ao do grupo G4BENT. No fim do ensaio, os linguados

mantidos no regime G4BENT tinham o maior comprimento, seguido do grupo controlo e por último do G4MO.

Após contagem final dos peixes e a soma do número de peixes utilizados nas amostragens, bem como os peixes contabilizados como mortos, foi estimado o número inicial de peixes por tanque, indicado na Tabela 21.

Tabela 21 – Número inicial de peixes por cada tanque

Tratamento	Tanques	Nº de linguados
<b>G4MO</b>	7	1044
	10	807
	13	684
<b>G4BENT</b>	8	793
	11	875
	14	691
<b>Controlo</b>	9	996
	12	995
	15	1187

Uma vez que os peixes foram triados e divididos entre grandes e pequenos, a média de cada tratamento pode ser observada na Tabela 22.

Tabela 22 – Quantidade média de peixes pequenos e grandes de cada tratamento

	Tratamentos		
Número de peixes	G4MO	G4BENT	Controlo
<b>Grandes</b>	433	431	776
<b>Pequenos</b>	220	194	129

Com base no número de indivíduos, no início e no final do ensaio, foi determinada a taxa de sobrevivência, como exposto na Tabela 23 e no Gráfico 32.

Tabela 23 - Taxas de sobrevivência entre os diferentes tratamentos<sup>1</sup>

Tratamentos		
G4MO	G4BENT	Controlo
82,±6,3 <sup>a</sup>	89,3±3,4 <sup>ab</sup>	95,1±2,1 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p<0.05$ ).

No geral a taxa de sobrevivência foi muito alta, variando entre 82 e 95% (Tabela 23; Gráfico 32); tendo sido máxima para o tratamento controlo e mínima para o tratamento G4MO. Não foram encontradas diferenças significativas entre o tratamento G4BENT e os restantes.

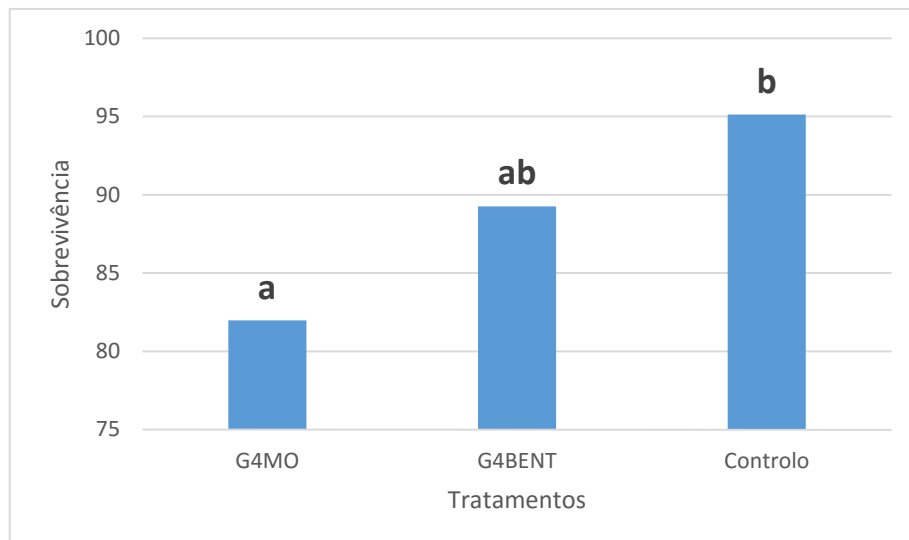


Gráfico 32 - Taxa de sobrevivência dos linguados para cada tratamento. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p<0.05$ ).

A taxa de conversão alimentar (FCR) foi maior no grupo G4MO, seguida do G4BENT e do controlo, que teve um FCR inferior, como se verifica no Gráfico 33. Após a análise dos dados pela ANOVA, verifica-se que existem diferenças significativas entre o G4MO e o controlo, todavia, o G4BENT não apresenta diferenças significativas com os restantes tratamentos.

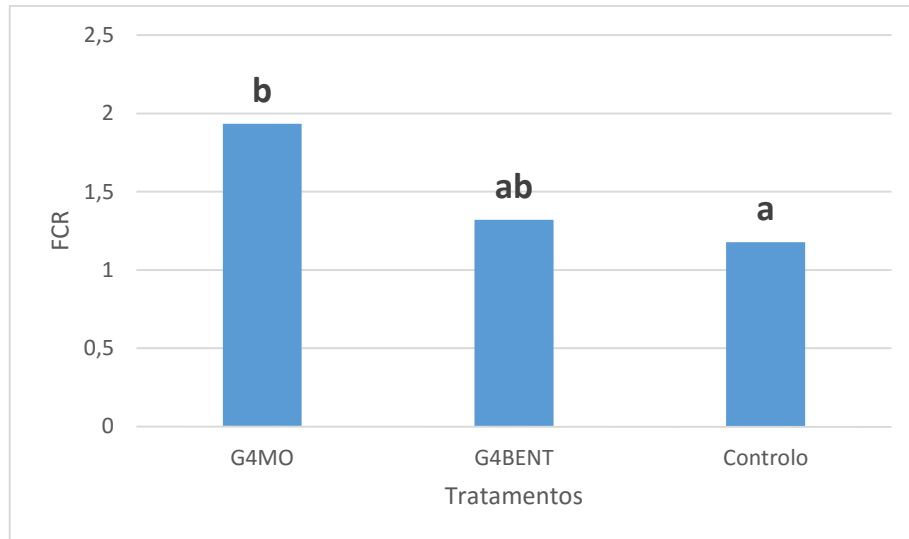


Gráfico 33 – Taxa de conversão alimentar (FCR) entre os diferentes tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

A taxa de crescimento relativo (RGR%,  $\text{dia}^{-1}$ ) estimada para cada grupo experimental é apresentada na Tabela 24 e no Gráfico 34.

Tabela 24 - Média da taxa de crescimento relativo (RGR, %  $\text{dia}^{-1}$ ) de cada tratamento. <sup>11</sup>

Tratamentos		
G4MO	G4BENT	Controlo
14,9±0,3 <sup>a</sup>	15,5±0,4 <sup>a</sup>	15,2±0,2 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Valores apresentados como média±desvio padrão. Na mesma linha, média seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p < 0.05$ ).

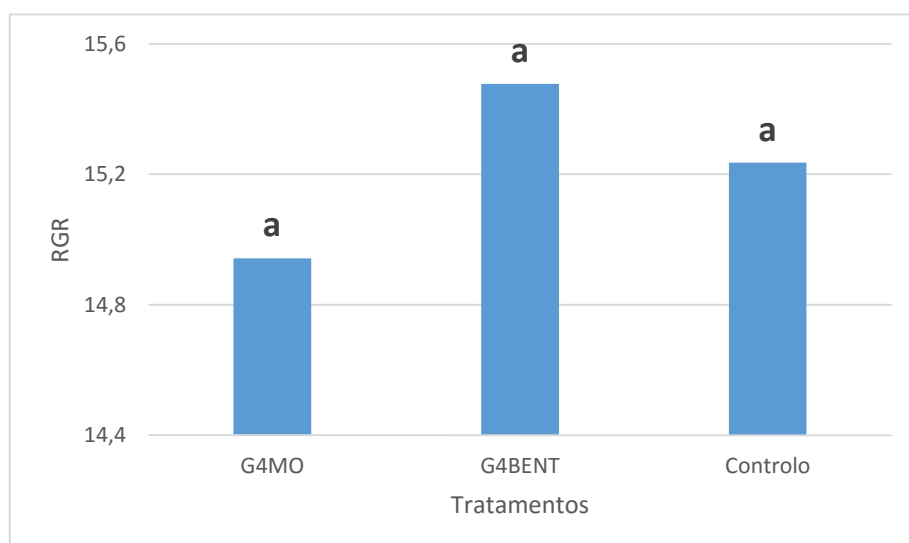


Gráfico 34 - Taxa de crescimento relativa (RGR, %  $\text{dia}^{-1}$ ) entre tratamentos. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

Não existiram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 15; Gráfico 34). Embora o G4BENT tenha uma maior taxa de crescimento esta não foi significativamente superior aos restantes tratamentos.

## Discussão

Durante a fase larvar, o regime alimentar tem um papel fundamental no crescimento e na sobrevivência das larvas, principalmente quando o alimento inerte é inserido muito cedo na alimentação larvar (Engrola et al., 2009a; Engrola et al., 2009b). Como tal, é necessário identificar o melhor regime alimentar a ser utilizado na fase de desmame, uma vez que é uma fase crítica do desenvolvimento das larvas (Engrola et al., 2009a; Engrola et al., 2009b). Neste ensaio, o crescimento foi avaliado pelo peso seco e comprimento total das larvas amostradas. O tratamento em que as larvas foram alimentadas em regime de co-alimentação desde a abertura da boca, foi o que revelou menor crescimento em todas as amostragens. No entanto, aos 45 DAH os linguados do grupo controlo (grupo não submetido a co-alimentação com desmame abrupto aos 32 DAH) e do grupo G4MO (submetido a co-alimentação à abertura de boca) apresentaram menor peso e comprimento do que larvas do grupo G4BENT (submetido a co-alimentação após a metamorfose). Anteriormente, Engrola et al. (2009a) verificou que, embora as larvas de linguados co-alimentadas desde a abertura de boca fossem significativamente menores na fase pelágica e aos 40 DAH, aos 68 DAH, estas larvas seriam maiores que as dos restantes tratamentos. Tal não foi verificado no presente ensaio, uma vez que no tratamento G4MO (co-alimentação das larvas à abertura da boca) o peso seco e o comprimento foram sempre menores, tanto no início do ensaio como no final. Contudo, num outro ensaio a cargo dos mesmos autores, Engrola et al. (2010) demonstrou que, usando diferentes quantidades de substituição de artémia na co-alimentação à abertura de boca, o grupo que se alimentou somente com alimento vivo obteve um crescimento maior e mais rápido que qualquer regime de co-alimentação, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

No presente ensaio, no final da fase pelágica, aos 15 DAH, tanto o peso seco como o comprimento total das larvas foi significativamente maior no tratamento controlo (sem co-alimentação) que no tratamento em que se efetuou co-alimentação das larvas após a metamorfose (tratamento G4BENT). Alguns autores sugerem que as larvas utilizam as enzimas presentes no alimento vivo para facilitar a digestão até que o sistema digestivo se encontre completamente diferenciado e desenvolvido (Kolkovski,

2001). Como tal, pode-se considerar que quando o alimento inerte começou a ser introduzido aos 15 DAH o sistema digestivo já se encontrava desenvolvido o suficiente para digerir este tipo de alimentação.

No final do ensaio, os linguados co-alimentados a partir da fase bentónica teriam um peso seco e um comprimento significativamente maior que os linguados alimentados com dieta inerte a partir dos 32 DAH. Em Engrola et al. (2009a), foi verificado que as larvas alimentadas somente com alimento vivo, durante a fase pelágica, obtiveram um maior crescimento do que as larvas alimentadas em regime de co-alimentação desde a abertura da boca, confirmando o verificado neste estudo. O mesmo não se verifica no estudo de Cañavate et al. (1999), em que a co-alimentação até à metamorfose não afetou o crescimento das larvas de linguado. Isto indica que a co-alimentação é um regime alimentar benéfico para as larvas de linguado senegalês, no entanto só deve ser efetuada após a metamorfose das larvas, e quando estas se encontram na sua forma bentónica.

Alguns autores observaram que o desmame abrupto pode levar a um período em que o crescimento é afetado (Engrola et al., 2009a). O desmame do tratamento controlo foi realizado aos 32 DAH verificando-se uma redução do crescimento entre a amostragem dos 32 DAH e a dos 45 DAH. Assim, os linguados do grupo controlo que aos 32 DAH (amostragem antes do início da introdução de alimento inerte) tinham um peso seco um comprimento total significativamente mais elevado do que os restantes tratamentos, aos 45 DAH foi superado pelos restantes tratamentos. Em concordância com estes resultados, Mai et al. (2009) descrevem que a co-alimentação de larvas de linguado, a partir de 1 mg de peso larvar, pode melhorar a taxa de sobrevivência no desmame, uma vez que pode melhorar a maturação digestiva e estimular a secreção digestiva, embora se verifique uma dispersão de tamanhos entre os indivíduos. O tratamento G4BENT, co-alimentado a partir dos 15 DAH, tinha como peso médio antes do início da co-alimentação  $0,81 \pm 0,25$  mg, confirmando o descrito em Mai et al. (2009). Como recomendado por Engrola et al. (2007), o desmame deve ser iniciado quando as larvas têm entre 5 e 10 mg de peso seco. O desmame nos tratamentos G4MO e G4BENT foram realizados aos 2 DAH e aos 15 DAH, com um peso de  $3,9 \pm 1,6$  mg e de  $5,4 \pm 1,4$  mg, respetivamente. No desmame do controlo (32 DAH) as larvas tinham um peso seco de  $15,4 \pm 2,1$  mg. O único tratamento que se insere nos valores apresentados por Engrola et al. (2007) é o G4BENT, podendo este fator ter contribuído para os bons resultados obtidos neste tratamento.

A taxa de sobrevivência foi afetada pelo regime alimentar utilizado. O controlo (95%) obteve taxas de sobrevivência significativamente superiores que o G4MO (82%), no entanto, no tratamento G4BENT (89,3%) a taxa de sobrevivência não se diferenciou dos restantes. Os resultados obtidos neste ensaio foram maiores aos descritos para a fase bentónica (Cañavate et al., 1999; Engrola et al. (2009a, 2010); Mai et al., 2009). Neste último, as larvas com uma alimentação com substituição de artémia por alimento inerte à abertura da boca obtiveram uma sobrevivência de  $30\% \pm 9,9$  enquanto as larvas alimentadas com alimento vivo tiveram uma sobrevivência maior ( $38\% \pm 7,7$ ). Contudo outros autores não referem diferenças significativas na taxa de sobrevivência entre os diferentes protocolos alimentares (Cañavate et al., 1999; Engrola et al., (2007, 2009a, 2010); Mai et al., 2009). No entanto, a taxa de sobrevivência observada no estudo de Engrola et al. (2007) foi superior do que no presente trabalho.

Não foram verificadas diferenças significativas na taxa de crescimento relativa (RGR) entre os tratamentos do presente ensaio. O mesmo se verificou em Rosenlund (1997); Cañvate et al. (1999) e Engrola et al. (2007). No entanto, Engrola et al. (2009a) observou uma menor RGR nas larvas alimentadas somente com alimento vivo ( $5,52\% \text{ dia}^{-1}$ ) do que nas alimentadas em regime de co-alimentação à abertura da boca ( $11,47\% \text{ dia}^{-1}$ ). À semelhança do que foi observado para peso seco e comprimento individual dos linguados, no final do ensaio a taxa de crescimento relativa do tratamento G4MO ( $15,0\% \pm 0,3$ ) foi o mais baixo, seguido do controlo ( $15,2\% \pm 0,2$ ) e por fim do G4BENT ( $15,5\% \pm 0,4$ ).

Como descrito por Mai et al. (2009), alguns estudos verificam que estratégias de co-alimentação levam a um aumento do crescimento e sobrevivência após o desmame em *Solea senegalensis* e *Cynoglossus semilaevis*, e a um aumento da sobrevivência e crescimento em *Salminus brasilienses*. Durante o decorrer do ensaio, verificou-se que as larvas se encontravam muito fragilizadas e a demonstrar sinais de doenças, daí o ensaio terminar mais cedo do que era esperado, passando dos 80 DAH para os 61 DAH. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a co-alimentação após a metamorfose das larvas de linguado senegales é benéfica em termos de performance de crescimento. Este estudo realça que a co-alimentação pode favorecer o crescimento posterior das larvas, embora esta não possa ser efetuada muito cedo, necessitando que as larvas se desenvolvam a nível digestivo e finalizem a metamorfose para conseguirem utilizar o alimento inerte fornecido.

Este ensaio foi realizado numa empresa de aquacultura, com alguns constrangimentos relativamente aos ensaios realizados em ambiente laboratório. Como

tal, as idades de desmame e de metamorfose, não foram as mesmas, dos diferentes estudos analisados nesta discussão. Tal confirma a necessidade de realização de ensaios, em parceria com empresas, uma vez que as idades e pesos das larvas em ambiente real de produção diferem das obtidas em laboratório, dificultando, portanto, a transposição dos resultados obtidos em laboratório para as condições de empresa.



## V – Conclusões

Com a realização do primeiro ensaio conclui-se que a utilização de dieta com maior substituição de óleos marinhos por óleos vegetais (dieta A3) induz um maior crescimento das larvas de linguado senegalês, durante a fase de desmame. Esta dieta produziu uma taxa de crescimento superior à da dieta atualmente em uso na empresa, ou as outras duas dietas com níveis de incorporação mais elevados de óleos marinhos. É interessante verificar, que os bons resultados desta dieta com níveis moderado de inclusão de óleos marinhos manteve-se também quando introduzida em juvenis. Todavia, a dieta com maior percentagem de substituição de óleos marinhos por vegetais (dieta A3) leva a uma taxa de sobrevivência inferior, comparativamente à dieta sem inclusão de óleos vegetais, muito embora a taxa de sobrevivência com esta dieta tenha, mesmo assim, sido relativamente elevada (87%). Uma dieta com substituição moderada de óleos marinhos por vegetais poderá ser uma boa estratégia a nível de produção, uma vez que o crescimento é mais rápido que com dietas sem óleos vegetais, além de ser economicamente mais acessível, baixando os custos de produção.

Quanto ao regime alimentar das larvas de linguado senegalês, a realização de co-alimentação com alimento vivo e alimento inerte após a metamorfose (15 DAH) induz um maior crescimento das larvas após o desmame, comparativamente ao desmame abrupto aos 32 DAH e à co-alimentação aos 2 DAH. A sobrevivência não foi afetada relativamente ao controlo, o que indica que um regime de co-alimentação aos 15 DAH até aos 25 DAH (altura em que se inicia o desmame) é um bom regime alimentar a ser aplicado a nível industrial. De fato, para além da taxa de crescimento das larvas ser similar ao obtido nas condições atuais de produção da empresa, o recurso ao alimento vivo é menor, o que tem um impacto muito positivo em termos de custos de produção e associado à produção e manutenção da produção de alimento vivo.

Com este trabalho atesta-se, uma vez mais, que o alimento e o protocolo alimentar são de todo um fator muitíssimo importante durante uma das fases mais críticas da produção intensiva de linguado senegalês - a fase larvar.

## VI - Bibliografia

- Almaida-Pagán, P. F., Hernández, M. D., García, B. G., Madrid, J. A., Costa, J. D., Mendiola, P. (2007). Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture*, 272(1-4), 589-598.
- Andrade, T. d. S. (2012). *Effects of different stocking densities on growth, feed-intake, oxidative stress status and humoral immune parameters of Senegalese sole (Solea senegalensis) juveniles*. (Dissertação de Mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto
- Attramadal, K. J. K., Øie, G., Størseth, T. R., Alver, M. O., Vadstein, O., Olsen, Y. (2012). The effects of moderate ozonation or high intensity UV-irradiation on the microbial environment in RAS for marine larvae. *Aquaculture*, 330-333, 121-129.
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*, 51, 26-35.
- Bayarri, M. J., Munoz-Cueto, J. A., Lopez-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Lama, M. A. R. d., Madrid, J. A., Sanchez-Vazquez, F. J. (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiol Behav*, 81(4), 577-583.
- Benitez-Dorta, V., Caballero, M. J., Izquierdo, M., Manchado, M., Infante, C., Zamorano, M. J., Montero, D. (2013). Total substitution of fish oil by vegetable oils in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) diets: effects on fish performance, biochemical composition, and expression of some glucocorticoid receptor-related genes. *Fish Physiol Biochem*, 39(2), 335-349.
- Blanco-Vives, B., Villamizar, N., Ramos, J., Bayarri, M. J., Chereguini, O., Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Effect of daily thermo- and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 306(1-4), 137-145.
- Boglino, A., Darias, M. J., Ortiz-Delgado, J. B., Özcan, F., Estévez, A., Andree, K. B., Gisbert, E. (2012). Commercial products for Artemia enrichment affect growth performance, digestive system maturation, ossification and incidence of skeletal deformities in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 324-325, 290-302.
- Bonacic, K., Campoverde, C., Sastre, M., Hachero-Cruzado, I., Ponce, M., Manchado, M., Morais, S. (2015). Mechanisms of lipid metabolism and transport underlying superior performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) larvae fed diets containing n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 450, 383-396.
- Borges, P., Reis, B., Fernandes, T. J. R., Palmas, Â., Castro-Cunha, M., Médale, F., Valente, L. M. P. (2014). Senegalese sole juveniles can cope with diets devoid of supplemental fish oil while preserving flesh nutritional value. *Aquaculture*, 418-419, 116-125.
- Branco, M. A. d. C. (2003). Estudo da produção de linguado (*Solea senegalensis* KAUP, 1858) em tanques de terra

- Cabral, E. M., Fernandes, T. J. R., Campos, S. D., Castro-Cunha, M., Oliveira, M. B. P. P., Cunha, L. M., Valente, L. M. P. (2013). Replacement of fish meal by plant protein sources up to 75% induces good growth performance without affecting flesh quality in on-growing Senegalese sole. *Aquaculture*, 380-383, 130-138.
- Cahu, C., Infante, J. Z. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200, 161-180.
- Cañavate, J. P., Fernández-Díaz, C. (1999). Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture*, 174, 255-263.
- Cañavate, J. P. (2005). Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21, 147-154.
- Cañavate, J. P., Zerolo, R., Fernández-Díaz, C. (2006). Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture*, 258(1-4), 368-377.
- Cassamo, A. I. X. (2012). *Aquicultura em Portugal, Produção intensiva de pregado (Psetta maxima)*. (Dissertação de Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Castro, S., Corraze, G., Panserat, S., Oliva-Teles, A. (2014). Effects of fish oil replacement by a vegetable oil blend in digestibility, postprandial serum metabolite profile, lipid and glucose metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquac. Nutr.*, 21, 592-603.
- Dinis, M. T., Reis, J. (sem data). Culture of *Solea* spp. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*, 9-19.
- Dinis, M. T. (1992). Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to an artificial diet. *Aquaculture and Fisheries Management*, 23, 515-520.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176, 27-38.
- Dionísio, G., Campos, C., Valente, L. M. P., Conceição, L. E. C., Cancela, M. L., Gavaia, P. J. (2012). Effect of egg incubation temperature on the occurrence of skeletal deformities in *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(3), 471-476.
- Ebeling, J., Jensen, G., Losordo, T., Masser, M., McMullen, J., Pfeiffer, L., Sette, M. (1995). *Model Aquaculture Recirculation System (MARS)*. (Engineering and Operations Manual), Iowa State University, Ames, Iowa.
- Engrola, S., Conceição, L. E. C., Gavaia, P. J., Cancela, M. L., Dinis, M. T. (2005). Effects of pre-weaning feeding frequency on growth, survival, and deformation of senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 57(1), 10-18.

- Engrola, S., Conceição, L. E. C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M. T. (2007). Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Research*, 38(7), 696-707.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L. E. C., Gavaia, P. J., Ribeiro, L., Dinis, M. T. (2009a). Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture*, 288(3-4), 264-272.
- Engrola, S., Mai, M., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C. (2009b). Co-feeding of inert diet from mouth opening does not impair protein utilization by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 287(1-2), 185-190.
- Engrola, S., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C. (2010). Senegalese sole larvae growth and protein utilization is depressed when co-fed high levels of inert diet and *Artemia* since first feeding. *Aquaculture Nutrition*, 16(5), 457-465.
- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture (pp. 223). Rome.
- FAO. (2015). FAO's role in aquaculture. Retrieved 06/08, 2015, from <http://www.fao.org/aquaculture/en/>
- Fernandes, T. J., Alves, R. C., Souza, T., Silva, J. M., Castro-Cunha, M., Valente, L. M., Oliveira, M. B. (2012). Lipid content and fatty acid profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles as affected by feed containing different amounts of plant protein sources. *Food Chem*, 134(3), 1337-1342.
- Ferreira, P. M. P. (2009). *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*: Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P.
- FishBase. (2015). Retrieved 18/09, 2015, from <http://www.fishbase.org/summary/Solea-senegalensis.html>
- Gavaia, P. J., Dinis, M. T., Cancela, M. L. (2002). Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 211, 305-323.
- Gomes, J. M. d. S. (2012). *Utilização de fontes proteicas em dietas para linguado do senegal (Solea senegalensis)*. (Dissertação de Mestrado), Faculdades de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A. (2012). Effect of temperature and dietary protein/lipid ratio on growth performance and nutrient utilization of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquacult Nutr*, 18, 98-106.
- Guerreiro, I., Peres, H., Castro, C., Perez-Jimenez, A., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A. (2014). Water temperature does not affect protein sparing by dietary carbohydrate in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquac. Res.*, 45, 289-298.
- Guillen, J., Motova, A. (2013). *Summary of the 2013 Economic Performance Report on the EU Aquaculture Sector (STECF 13-30)*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

- HACH. (2015). NitriVer® 3 Nitrite Reagent Powder Pillows, 10 mL, pk/100. Retrieved 18/09, 2015, from <http://www.hach.com/nitriver-3-nitrite-reagent-powder-pillows-10-ml-pk-100/product?id=7640208934>
- Imsland, A. K., Foss, A., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., White, P. (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13, 379-407.
- INE, I. P. (2015). *Estatísticas da Pesca 2014*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- Infante, J. L. Z., Cahu, C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130, 447-487.
- Kolkovski, S. (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles - implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200, 181-201.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. *FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER*. 361. Retrieved 16/09, 2015, from <http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e00.htm>
- Mai, M. G., Engrola, S., Morais, S., Portella, M. C., Verani, J. R., Dinis, M. T., Conceição, L. E. C. (2009). Co-feeding of live feed and inert diet from first-feeding affects *Artemia* lipid digestibility and retention in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 296(3-4), 284-291.
- Marinho, G., Peres, H., Carvalho, A. P. (2012). Effect of feeding time on dietary protein utilization and growth of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Research*, 45(5), 1-6.
- Martins, C. I. M., Pistrin, M. G., Ende, S. S. W., Eding, E. H., Verreth, J. A. J. (2009). The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 291(1-2), 65-73.
- Martins, C. I. M., Eding, E. H., Verdegem, M. C. J., Heinsbroek, L. T. N., Schneider, O., Blancheton, J. P., Verreth, J. A. J. (2010). New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 43(3), 83-93.
- Matusse, D. N. R. (2012). *Avaliação da qualidade dos ovos e das larvas de Solea senegalensis (Kaup, 1858) através da manipulação alimentar dos seus reprodutores*. (Dissertação de Mestrado), UNIVERSIDADE DOS AÇORES, Angra do Heroísmo.
- Mestre, P. M. G. (2008). *Elaboração de um projecto de um unidade de piscicultura*. (Dissertação de Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Mirzoyan, N., Tal, Y., Gross, A. (2010). Anaerobic digestion of sludge from intensive recirculating aquaculture systems: Review. *Aquaculture*, 306(1-4), 1-6.
- Morais, S., Narciso, L., Dores, E., Pousão-Ferreira, P. (2004). Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on larval growth, survival and fatty acid profile. *Aquaculture International*, 12, 281-298.

- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E. C., Constenla, M., Costas, B., Dinis, M. T. (2014). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 6, 1-37.
- Moreira, N., Soares, S., Valente, L. M., Castro-Cunha, M., Cunha, L. M., Pinho, P. G. d. (2014). Effect of two experimental diets (protein and lipid vegetable oil blends) on the volatile profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) muscle. *Food Chem*, 153, 327-333.
- Navarro-Guillen, C., Engrola, S., Castanheira, F., Bandarra, N., Hachero-Cruzado, I., Tocher, D. R., Moraes, S. (2014). Effect of varying dietary levels of LC-PUFA and vegetable oil sources on performance and fatty acids of Senegalese sole post larvae: puzzling results suggest complete biosynthesis pathway from C18 PUFA to DHA. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 167, 51-58.
- Norambuena, F., Moraes, S., Estévez, A., Bell, J. G., Tocher, D. R., Navarro, J. C., Duncan, N. (2013). Dietary modulation of arachidonic acid metabolism in senegalese sole (*Solea Senegalensis*) broodstock reared in captivity. *Aquaculture*, 372-375, 80-88.
- NRC. (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington, DC: National Academies Press.
- Pedersen, L.-F., Pedersen, P. B. (2012). Hydrogen peroxide application to a commercial recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering*, 46, 40-46.
- Pescanova. História. Retrieved 18/09, 2015, from <http://www.pescanova.pt/pescanova/historia/>
- Pinho, J. C., Monteiro, A. P., Sá, E. S. d. (2011). *Guias Práticos Regionais de Empreendedorismo e de promoção de Competitividade - Lazer*. Braga.
- Portuguesa, G. d. R. (2013). Governo quer duplicar produção de aquacultura até 2015. Retrieved 12/08, 2015, from <http://www.portugal.gov.pt/pt/os-ministerios/ministerio-da-agricultura-e-do-mar/mantenha-se-atualizado/20130121-mamaot-conf-mar.aspx>
- Reis, B., Cabral, E. M., Fernandes, T. J. R., Castro-Cunha, M., Oliveira, M. B. P. P., Cunha, L. M., Valente, L. M. P. (2014). Long-term feeding of vegetable oils to Senegalese sole until market size: Effects on growth and flesh quality. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet. *Aquaculture*, 434, 425-433.
- Rijn, J. v. (2013). Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 53, 49-56.
- Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C. (1997). Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture*, 155, 183-191.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Manchado, M., Cañavate, J. P. (2008). Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture*, 285(1-4), 84-89.



- Sánchez, P., Ambrosio, P. P., Flos, R. (2010). Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 300(1-4), 93-101.
- Sea8. (2015). Better fish Better business Better world. Retrieved 18/09, 2015, from <http://www.sea8.eu/pt/>
- Støttrup, J. G., McEvoy, L. A. (2003). *Live feeds in marine aquaculture*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Torstensen, B. E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., Waagbø, R., Hemre, G. I., Berntssen, M. H. G. (2008). Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture*, 285(1-4), 193-200.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1, 10-57.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P., Bell, J. G. (2005). The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia feeding period. *Aquaculture*, 249(1-4), 353-365.
- Villanueva, J. L. R., Alonso, J. B. P. (2014). *Cultivo del lenguado senegalés (Solea senegalensis)* (Vol. 7).
- Zhang, S.-Y., Li, G., Wu, H.-B., Liu, X.-G., Yao, Y.-H., Tao, L., Liu, H. (2011). An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering*, 45(3), 93-102.